

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 582**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 31/4439** (2006.01)

**A61K 31/4245** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2012 PCT/EP2012/050818**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012 WO2012098207**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2012 E 12701341 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2666016**

54 Título: **Uso de BUBR1 como un biomarcador de la respuesta de fármacos a furazanobencimidazoles**

30 Prioridad:

**21.01.2011 EP 11151677**

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

**29.06.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LANE, HEIDI ALEXANDRA;  
BACHMANN, FELIX;  
BREULEUX, MADLAINA;  
BOUTROS, MICHAEL;  
GILBERT, DANIEL y  
ZHANG, XIAN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones :**

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

ES 2 620 582 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

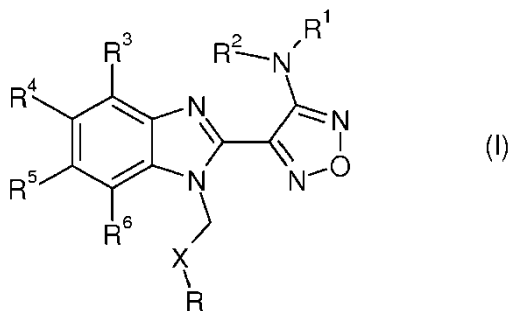
Uso de BUBR1 como un biomarcador de la respuesta de fármacos a furazanobencimidazoles

5 La presente invención se refiere al uso de BUBR1 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-benzimidazol-2-il}-furazan-3-ilamino)propionitrilo (BAL27862). En otros aspectos se refiere a métodos y kits, así como a métodos de tratamiento que implican el uso del biomarcador.

10 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 15 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 20 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 (bomba de 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 25 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

30 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-carbonilo, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en 35 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

10 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;

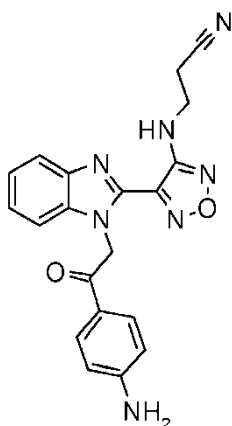
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos;

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 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:

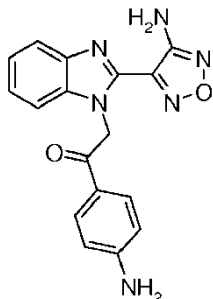


Nombre químico:

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

O en esta memoria como Compuesto A

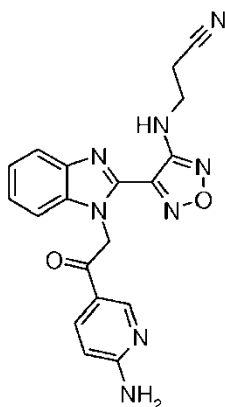
Otros compuestos ejemplificados en el documento WO2004/103994 A1 como ejemplos 50 y 79, respectivamente, tienen las estructuras y nombres químicos que se indican a continuación:



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

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

10 o en esta memoria como Compuesto C.

BAL27862 ha demostrado actividad a lo largo de un amplio panel de modelos experimentales de xenoinjertos de tumores sólidos. Además de ello, la actividad se mantuvo 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 vio afectada por la sobre-expresión de la bomba de P-gp en ningún 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).

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 consideradas óptimas 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).

El documento WO 2005/020794 estudia la determinación de la quimioselectividad de células cancerosas a taxanos, evaluando el efecto del taxano sobre el nivel de expresión o actividad, entre muchos otros, de BUBR1.

El documento WO 98/56910 describe una preparación de anticuerpos que específicamente se unen a una proteína huBUB1.

El póster "BAL27862: Un fármaco único que fija como objetivo microtúbulos suprime la dinámica de los microtúbulos, corta los microtúbulos y supera la resistencia a fármacos con Bcl-2 y relacionados con el subtipo tubulina", presentado en la 101ª Reunión Anual de la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer, describe que BAL27862 produce un fenotipo de microtúbulos único distinto del observado con alcaloides de la vinca.

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.

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 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 BUBR1 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 bajas de BUBR1 en una muestra se asocian con una resistencia inherente y adquirida a BAL27862 tal como se describe más adelante.

A BUBR1 se le ha asignada por el Comité de Nomenclatura de Genes Humanos el Número de Identificación HGNC ID: 1149 y Entrez Gene ID701. Una secuencia correspondiente a BUBR1 humana está disponible a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) número de referencia NP\_001202 (Figura 18, SEQ ID N° 1, NP\_001202.4).

5 BUBR1 es también conocida como hBUBR1 y BubR1; brote no inhibido por bencimidazoles 1, *S. cerevisiae*, homólogo, beta; gen de verificación mitótica BUB1B; BUB1B; BUB1 beta; quinasa de verificación mitótica Mad3L; MAD3L; proteína quinasa similar a MAD3; y SSK1. El nombre BUB1B se asocia habitualmente con la secuencia de ácido nucleico, mientras que publicaciones centradas en la proteína han utilizado habitualmente el término BUBR1. Por simplicidad, se utilizará el término BUBR1 en esta memoria para abarcar todos los sinónimos arriba  
10 mencionados y se referirá a esta entidad tanto al nivel de ácido nucleico como de proteína, según sea apropiado.

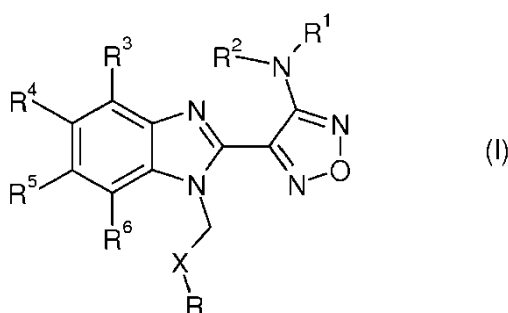
El nombre brote no inhibido por bencimidazoles fue asignado al homólogo de levadura por Hoyt *et al.* tras experimentos realizados con benomilo. (Hoyt MA. *et al.*, *S. Cerevisiae* Genes Required for Cell Cycle Arrest in Response to Loss of Microtubule Function. *Cell*, Vol. 66, 507-517, 9 de agosto de 1991). Esta publicación describe mutaciones en el homólogo de levadura *bub* que resultó en una hipersensibilidad a benomilo.

15 El homólogo humano está situado en el cromosoma 15q15. La secuencia del gen BUBR1 humano se publicó en el documento US 6.593.098 B1 y se identifica en esta memoria como BUB1A humana. El Ejemplo VI de esa patente describe un experimento realizado en células HeLa, en donde la actividad de BUB1A endógena (BUBR1) fue inhibida por microinyección de anticuerpos anti-huBUB1A. Las células inyectadas fueron luego sometidas a ensayo en cuanto a su capacidad de permanecer detenidas en la mitosis cuando se exponen a novodazol, un  
20 desestabilizante de microtúbulos. La patente establece que las células a las que se inyectaron anticuerpos huBUB1a fracasaron en detener la mitosis en presencia de nocodazol y prosiguieron a sufrir una apoptosis como resultado de una salida prematura de la mitosis.

De manera similar a la publicación de Hoyt, esto sugiere que la pérdida de la función de BUBR1 en células que luego son tratadas con nocodazol, resulta en una tasa incrementada de la apoptosis.

25 Sin embargo, en contraposición, los autores de la presente invención han encontrado que la pérdida de la expresión de BUBR1 está asociada con niveles reducidos de muerte celular en respuesta a compuestos de fórmula general I, es decir, resistencia a estos compuestos. De nueva se enfatiza que compuestos de fórmula general I tienen un efecto diferente sobre el fenotipo de células en comparación con otros agentes de microtúbulos, incluyendo otros desestabilizadores de microtúbulos, tal como se ve en las Figuras 3, 4, 5 y 6. La discrepancia entre los hallazgos, por un lado, del documento US 6.593.098 B1 y Hoyt y, por el otro lado, los autores de la presente invención confirma  
30 que no se pueden hacer predicciones de la información concerniente a agentes de microtúbulos convencionales si, o de qué manera genes particulares están implicados en la actividad de compuestos de fórmula general I.

Un aspecto de la presente invención se refiere al uso *ex vivo* de BUBR1 como un biomarcador para predecir la respuesta a un compuesto, en el que el compuesto es un compuesto de fórmula general I,



35 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  
40

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;

5 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, hidroxilo-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 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

15 en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxilo-alquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxilo, alcoxi inferior, hidroxilo-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 un heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, formilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi;

20 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, hidroxilo-alquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

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

25 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 amida hidrolizable in vivo de dicho compuesto, sal de tal éster o amida hidrolizable in vivo, y polimorfo de dicho compuesto,

30 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.

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.

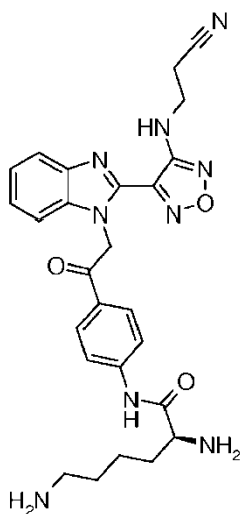
35 El biomarcador BUBR1 se mide *ex vivo* en una muestra o muestras tomadas del cuerpo humano o animal, tomadas preferentemente del organismo humano.

En una realización preferida, la invención se refiere al uso de BUBR1 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.

40 El derivado farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en una sal, solvato, pro-fármaco tal como se define en esta memoria, sal de un pro-fármaco y polimorfo de un compuesto de fórmula general I tal como se ha definido anteriormente. 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.

45

De manera particularmente preferible el compuesto es



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

5 Otro aspecto de la presente invención 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:

- a) medir una concentración de BUBR1 en una muestra pre-obtenida del sujeto para obtener un valor o valores que representan esta concentración; y
- 10 b) comparar el valor o los valores de la etapa a) con un valor estándar o un conjunto de valores estándar de los sujetos con el mismo tipo de cáncer, en donde una concentración de BUBR1 menor en la muestra en relación con el valor estándar o un conjunto de valores estándares es predictiva de la resistencia del cáncer de los sujetos al compuesto de fórmula (I).

La respuesta que se predice es la resistencia.

15 La medición de una concentración o concentraciones de BUBR1 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 concentración menor de BUBR1 en la muestra del sujeto con relación al valor estándar o un conjunto de valores estándar predice resistencia.

20 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 de ovario, cáncer gástrico, 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 cervical, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de colon y cáncer de pulmón. De manera más particularmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de colon y cáncer de pulmón. En otra realización particularmente preferida, en donde se determina la resistencia adquirida, el cáncer es cáncer de pulmón o cáncer de ovario. 25  
30 Todavía en otra realización particularmente preferida, en donde se determina la resistencia inherente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de colon y cáncer de pulmón, más preferiblemente cáncer de pulmón o cáncer gástrico.



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 BUBR1 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 BUBR1 en dicha muestra no es menor que un valor estándar o un conjunto de valores estándares.

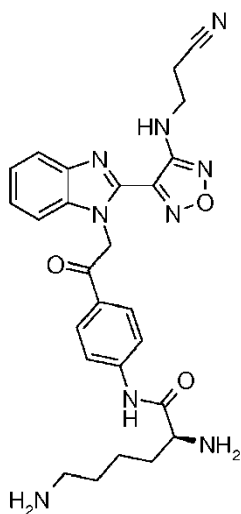
BUBR1 se puede utilizar en el tratamiento de una enfermedad neoplásica o autoinmune, preferiblemente cáncer, en donde una concentración de BUBR1 en una muestra del sujeto se mide para obtener un valor o valores que representan esta concentración, y el sujeto es tratado con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo como se define anteriormente, si la concentración de BUBR1 no es menor que un valor estándar o un conjunto de valores estándares.

La medición de una concentración de BUBR1 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, aumentando primero la concentración de BUBR1 en un sujeto que tiene una muestra con una menor concentración de BUBR1 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.

En aún otro aspecto, la invención se refiere a un kit 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 BUBR1 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 BUBR1 en la muestra se compara como se define en las reivindicaciones.

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



Nombre químico: [4-(2-{2-[4-(2-ciano-etilamino)-fuzan-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.

En una realización preferida, los reactivos en el kit comprenden un reactivo de captura que comprende un detector para BUBR1 y un reactivo detector. De manera especialmente preferida el reactivo de captura es un anticuerpo. También preferiblemente, la enfermedad se predice para ser resistente al tratamiento con dicho compuesto cuando BUBR1 es menor 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.

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**

5 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  
 10 Tratamiento con control de vehículo: Figuras 1A, 1C y 1E,  
 tratamiento con BAL27862: Figuras 1B, 1D y 1F.

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.

15 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.

20 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.

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.

35 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.

40 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.

45 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;  
 5 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;
- 10 Figura 7: muestra el análisis de inmunotransferencia de la expresión de BUBR1 después de la transfección con una agrupación de ARNip de BUBR1. Control: células no transfectadas tratadas con medio solo; Lipofectamina: células tratadas con el reactivo de transfección solo; NTC: células tratadas ARNip control no fijador de objetivo; BUBR1: células tratadas con una agrupación de ARNip específica para BUBR1. Los niveles de alfa-tubulina actúan como control de carga. Anticuerpos BUBR1 de Señalización Celular (CS) o BD Transduction Laboratories (BD) se utilizaron como se indica. Fig. 7A: células de cáncer cervical HeLa, Fig. 7B: células de cáncer de pulmón H460.
- 15 Figura 8: Efecto de una agrupación de ARNip de BUBR1 en respuesta a BAL27862 en células HeLa. Las células HeLa fueron sembradas y tratadas con ARNip. Después de 48 horas de incubación, las células fueron tratadas con DMSO solo o BAL27862 50 nM durante 24 horas antes del análisis. Panel superior: histograma de la fracción de células por pocillo (en %) que exhibe el fenotipo no tratado. Panel inferior: histograma del número de células por pocillo. Barras de error: desviación estándar. Control negativo: ARNip control no fijador de objetivo. BUBR1: células tratadas con la agrupación de ARNip específica para BUBR1.
- 20 Figura 9: Muestra el efecto de una agrupación de ARNip de BUBR1 en respuesta de células HeLa a BAL27862. Células HeLa en crecimiento exponencial fueron tratadas con medio solo (control), o transfectadas con lipofectamina, ARNip control no fijador de objetivo (NTC) o una agrupación de ARNip específica para BUBR1. Después de 24 horas, se añadió BAL27862 a las concentraciones indicadas, con vehículo DMSO utilizado como control. Después de tratamiento durante 48 horas, se evaluaron los efectos sobre la proliferación de células HeLa (Fig. 9A) y la viabilidad (Fig. 9B) utilizando el ensayo de proliferación de YO-PRO, a.u = los datos se expresan como unidades arbitrarias.
- 25 Figura 10: Muestra el efecto de una agrupación de ARNip de BUBR1 en respuesta de células H460 a BAL27862. Células H460 en crecimiento exponencial fueron transfectadas con ARNip control no fijador de objetivo (NTC) o una agrupación de ARNip específica para BUBR1. Después de 24 horas, se añadió BAL27862 a las concentraciones indicadas, con vehículo DMSO utilizado como control. Después de tratamiento durante 48 horas, se evaluaron los efectos sobre la proliferación de células H460 (Fig. 10A) y la viabilidad (Fig. 10B) utilizando el ensayo de proliferación de YO-PRO, a.u = los datos se expresan como unidades arbitrarias.
- 30 Figura 11: Muestra el efecto de una agrupación de ARNip de BUBR1 en respuesta de células MCF-7 a BAL27862. Células MCF-7 en crecimiento exponencial fueron tratadas con ARNip control no fijador de objetivo (NTC) o una agrupación de ARNip específica para BUBR1. Después de 24 horas, se añadió BAL27862 a las concentraciones indicadas, con vehículo DMSO utilizado como control. Después de tratamiento durante 48 horas, se evaluaron los efectos sobre la proliferación de células MCF-7 (Fig. 11A) y la viabilidad (Fig. 11B) utilizando el ensayo de proliferación de YO-PRO, a.u = los datos se expresan como unidades arbitrarias.
- 35 40 Figura 12: Muestra el efecto de una agrupación de ARNip de BUBR1 en respuesta de células HeLa, Panc1 y HCT116 a BAL27862. Células en crecimiento exponencial fueron tratadas con ARNip control no fijador de objetivo (NTC) o una agrupación de ARNip específica para BUBR1. Después de 24 horas, se añadió BAL27862 50 nM (HeLa, HCT116) o 30 nM (Panc1), con vehículo DMSO utilizado como control. Después de tratamiento durante 48 horas, se evaluaron los efectos sobre la proliferación de células HeLa (Fig. 12A), Panc1 (Fig. 12B) y HCT116 (Fig. 12C) utilizando el ensayo de Cristal Violeta, a.u = datos se expresan como unidades arbitrarias.
- 45 50 Figura 13: Muestra el efecto de ARNip de BUBR1 individuales en la respuesta de células HeLa a BAL27862. Células en crecimiento exponencial fueron tratadas con ARNip control no fijador de objetivo (NTC) o ARNip específicos para BUBR1 individuales (ARNip n<sup>o</sup>s 1, 2, 3 y 4 tal como se define en la sección de metodología experimental que figura más adelante). Después de 24 horas, se añadió BAL27862 50 nM, con vehículo DMSO utilizado como control. Después de tratamiento durante 48 horas se evaluaron los efectos sobre la proliferación de células HeLa (Fig. 13A)

utilizando el ensayo de Cristal Violeta y los efectos en la expresión de proteínas BUBR1 se evaluaron por inmunotransferencia (Fig 13B). a.u = datos se expresan como unidades arbitrarias.

5 Figura 14: Muestra que los niveles de proteína BUBR1 disminuyen en líneas tumorales con resistencia adquirida a BAL27862. Se seleccionaron líneas de células tumorales en cuanto a la resistencia a BAL27862 a través del cultivo *in vitro* en presencia de BAL27862. Sobre la base de las determinaciones de  $CI_{50}$ , los factores de resistencia de BAL27862 frente a líneas parentales fueron: A549 (3,0 veces); SKOV3 (7,6 veces – línea resistente 1); H460 (5,3 veces) (véase la Tabla 1). Extractos de proteínas de células enteras se prepararon a partir de líneas parentales y resistentes y se analizaron por inmunotransferencia en cuanto a la expresión de BUBR1. Los niveles de actina actúan como control de carga.

10 Figura 15: Muestra que las concentraciones de proteína BUBR1 disminuidos se mantienen en la línea tumoral SKOV3 durante el desarrollo de la resistencia. Se seleccionaron células tumorales SKOV3 para la resistencia a BAL27862 a través de cultivo *in vitro* en presencia de BAL27862 durante períodos de tiempo prolongados. Basado en las determinaciones de  $CI_{50}$ , los factores de resistencia de BAL27862 frente a líneas parentales fueron: SKOV3 resistente 1 (7,6 veces), SKOV3 resistente 2 (11,6 veces) (véase la Tabla 1). Se prepararon extractos de proteínas de células enteras a partir de líneas parentales y resistentes y se analizaron por inmunotransferencia para la expresión de BUBR1 utilizando el anticuerpo de BUBR1 BD Transduction Laboratories (BD). Concentraciones de alfa-tubulina actúan como un control de carga.

20 Figura 16: Muestra que las concentraciones de BUBR1 de células tumorales están disminuidos en tumores xenoinjertados derivados de pacientes definidos como resistentes a BAL27862 mediante análisis de crecimiento de colonias ex vivo. Se prepararon xenoinjertos de tumores derivados de pacientes (mantenidos en ratones inmunodeficientes), se fijaron y se tiñeron para la expresión de proteínas BUBR1 utilizando inmunohistoquímica. La resistencia a BAL27862, paclitaxel y vinblastina y la sensibilidad es como se define en la Tabla 2.

25 Figura 17: Muestra que para BUBR1, las concentraciones de proteína en las células tumorales son reflejados por sus niveles de expresión de ARN. Figura 17A: Se prepararon muestras a partir de líneas celulares HeLa y H460, y se realizó una RT-PCR cuantitativa en éstas para medir las concentraciones de ARN. Los resultados de HeLa se fijaron en 100%, y el gráfico muestra los niveles de expresión de ARN en la muestra de H460 con relación a los valores HeLa. Figura 17B: Extractos de proteínas de células enteras se prepararon a partir de de los mismos pasajes de las líneas celulares HeLa y H460 y luego se analizaron mediante inmunotransferencia utilizando anticuerpos de BUBR1 BD Transduction Laboratories (BD) para la expresión de proteínas BUBR1. Las concentraciones de alfa-tubulina actúan como control de carga.

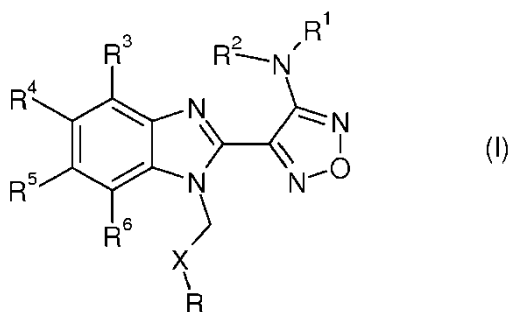
Figura 18: Muestra la secuencia de proteínas preferida de BUBR1 (SEQ ID No. 1)

Figura 19: Muestra la secuencia de ácido nucleico preferida de BUBR1 (SEQ ID N° 2)

### Descripción Detallada

#### Compuestos de fórmula I

35 Los compuestos 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 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;

- 10 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 amida hidrolizable in vivo de dicho compuesto, sal de dicho éster o amida hidrolizable in vivo, y polimorfo de dicho compuesto,

o en donde

R representa fenilo o piridinilo,

- 20 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;  
25 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 ciano-alquilo inferior;

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

- 30 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 amida hidrolizable in vivo de dicho compuesto, sal de dicho éster o amida hidrolizable in vivo, y polimorfo de dicho compuesto;  
35 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.

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, aminoalquilo inferior, arilo, arilo-alquilo inferior y acilo, y un átomo de carbono del anillo puede estar sustituido con alquilo inferior, aminoalquilo inferior, arilo, arilo-alquilo inferior, heteroarilo, alcoxi inferior, hidroxialcoxi inferior u oxo. Ejemplos de heterociclilo son pirrolidinilo, oxazolidinilo, tiazolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, dioxolanilo y tetrahidropiranilo.

- 45 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.

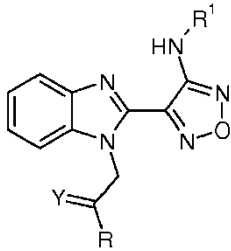
Preferiblemente, el compuesto de fórmula general I se define como en donde R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, acetilo, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH.

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

- 50 4-(1-fenacil-1H-bencimidazol-2-il)-furazan-3-ilamina,  
4-[1-(4-bromofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-ilamina oxima,

- 5 N-{4-[1-(4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furan-3-il}-acetamida,  
 4-[1-(4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furan-3-il-N-(2-cianoetil)-amina  
 4-[1-(4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furan-3-il-N-(3-hidroxi-propil)-amina,  
 4-[1-(3-amino-4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furan-3-ilamina  
 4-[1-(3-metoxi-4-metoximetoxi-fenacilo)-1H-bencimidazol-2-il]-furan-3-ilamina,  
 y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se define arriba.

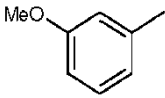
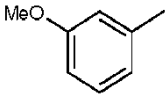
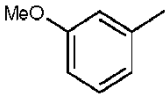
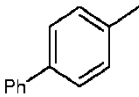
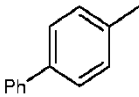
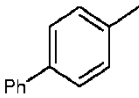
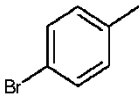
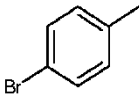
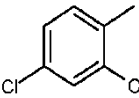
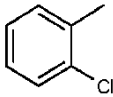
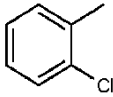
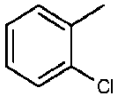
En otra realización preferida, el compuesto de fórmula general I es:



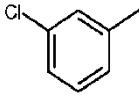
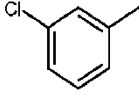
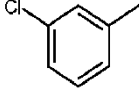
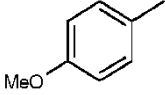
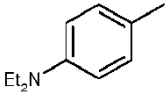
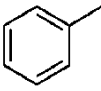
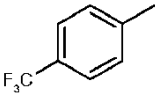
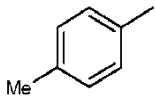
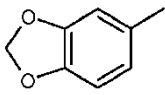
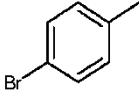
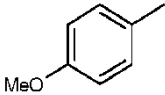
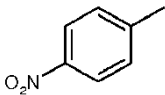
- 10 en donde  
 R, Y y R<sup>1</sup> se definen como sigue:

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

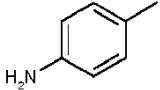
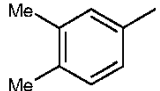
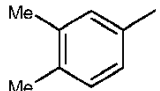
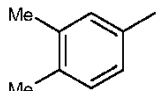
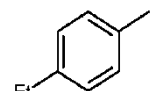
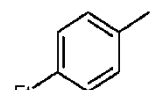
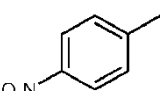
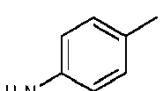
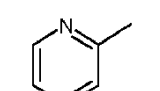
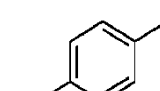
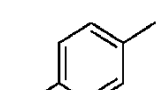
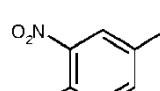
## ES 2 620 582 T3

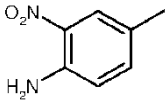
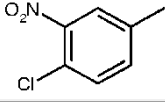
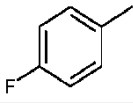
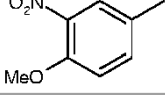
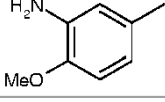
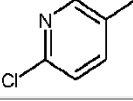
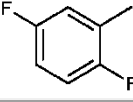

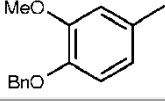
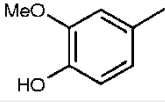
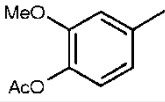
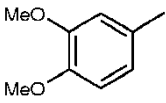
R	Y	R <sup>1</sup>
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	O	H
	NOMe	H
	O	H
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H

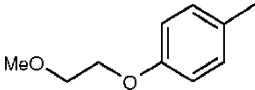
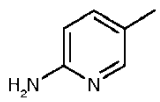
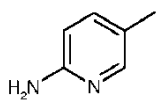
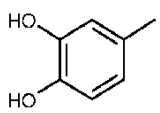
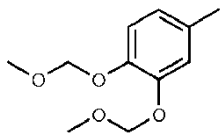
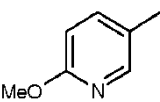
ES 2 620 582 T3

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



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

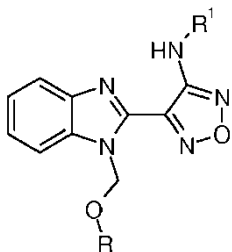
R	Y	R <sup>1</sup>
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H

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	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN

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

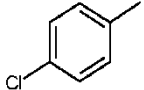
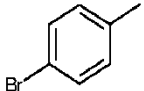
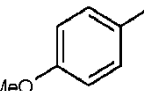
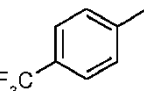
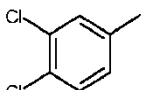
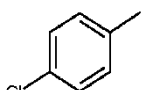
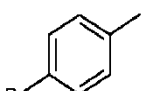
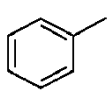
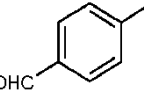
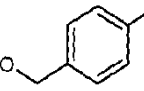
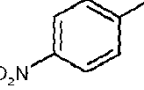
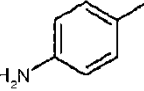
Aún en una realización preferida, el compuesto de fórmula general I se selecciona del grupo que consiste en:

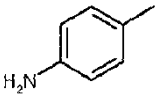
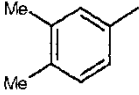
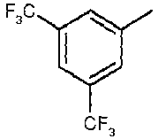
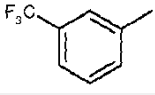
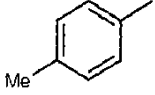
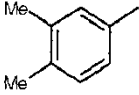
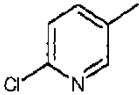
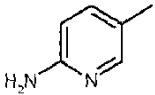
- 5 4-(1-fenoximetil-1H-bencimidazol-2-il)-furazan-3-ilamina,  
 4-[1-(4-fluorofenoximetil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-ilamina,  
 4-[1-(3,4-dimetilfenoximetil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-il-N-(2-cianoetil)-amina  
 y compuestos representados por la fórmula:



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

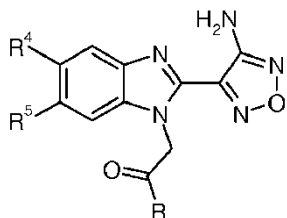
R	R <sup>1</sup>
---	----------------

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

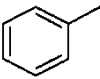
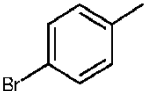
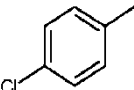
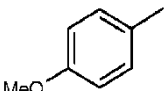
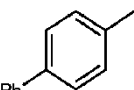
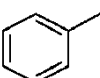
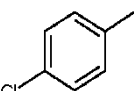
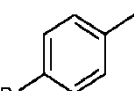
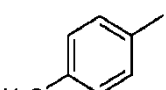
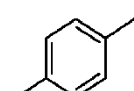
R	R <sup>1</sup>
	H
	H
	H
	H
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH
	H
	H

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

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

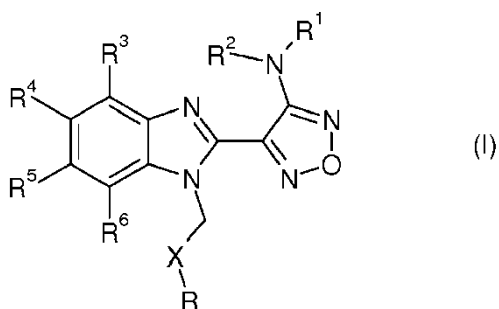


5 en donde R, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son como se definen a continuación

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



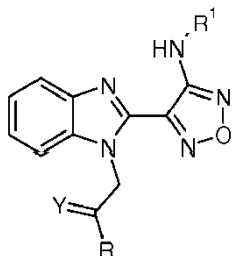
en donde  
R representa fenilo o piridinilo,

- 5 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;

X representa un grupo C=O;

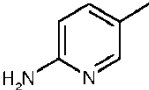
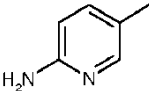
- 10 R<sup>1</sup> representa hidrógeno o ciano- alquilo inferior;  
R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> representan hidrógeno;  
y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se definen anteriormente,  
y en donde el prefijo inferior designa un 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



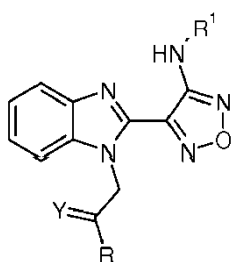
- 15 en donde R, Y y R<sup>1</sup> se definen como sigue:

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

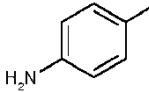
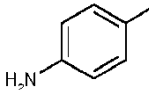
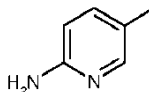
R	Y	R <sup>1</sup>
	O	H
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN

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:

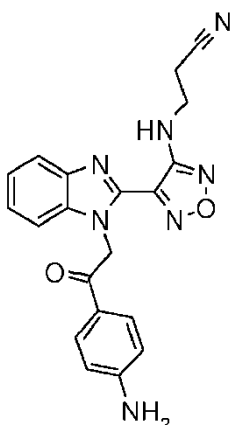
R	Y	R <sup>1</sup>
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
	O	H
	O	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN

5

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

De manera particularmente preferida, el compuesto es





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

El término derivado o derivados en la frase "derivado farmacéuticamente aceptable" o "derivados farmacéuticamente aceptables" de los 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 en esta memoria, y polimorfos y también sales de pro-fármacos de los mismos tal como se definen anteriormente.

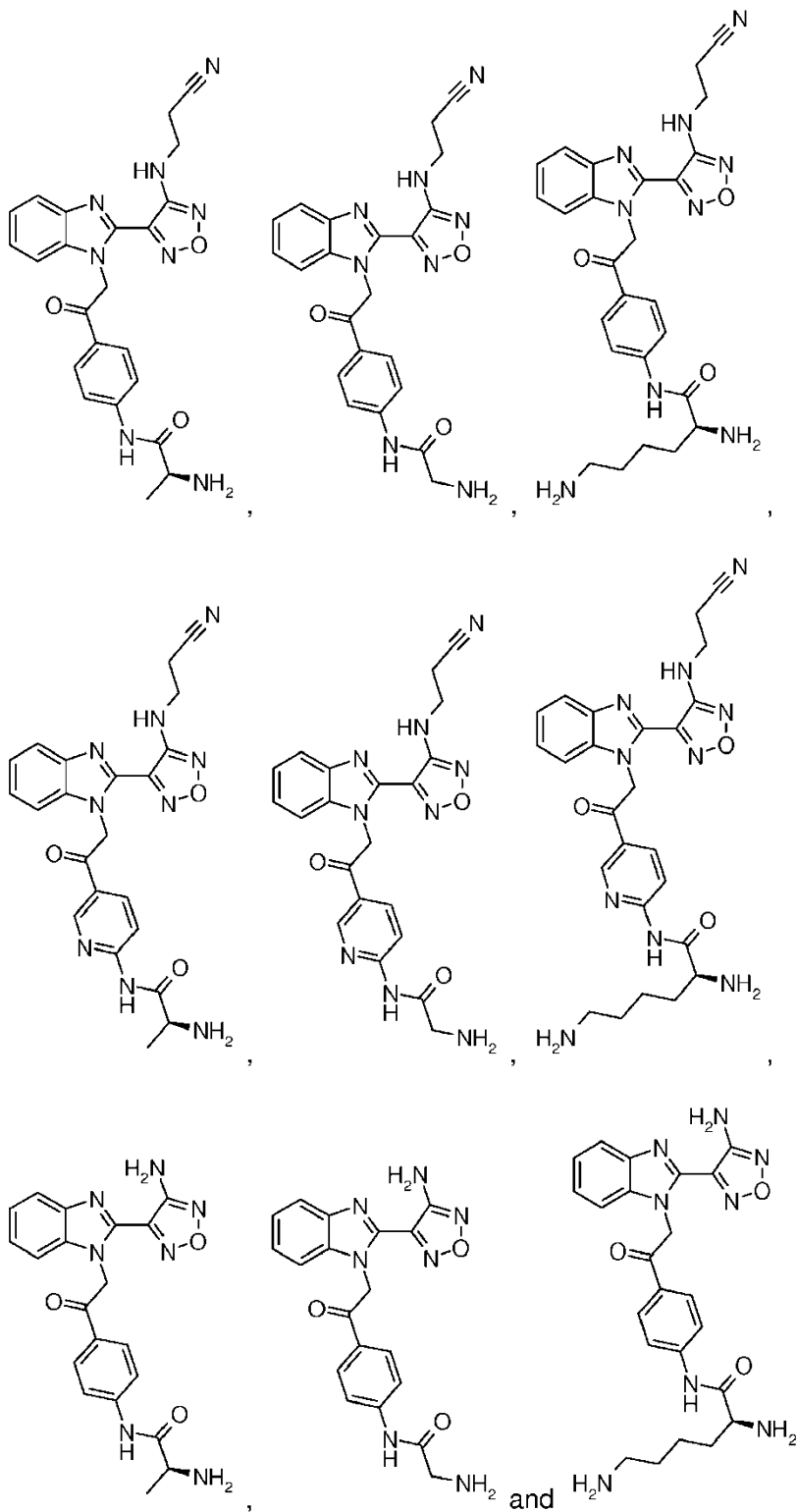
En una realización más preferida, se refiere a sales y pro-fármacos, así como a sales de profármacos de los mismos tal como se definen anteriormente.

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 adípico, 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.

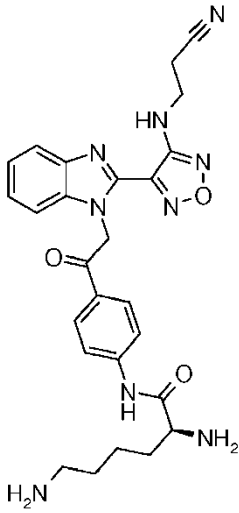
El compuesto se puede administrar en forma de un pro-fármaco que se descompone en el cuerpo humano o animal para dar el compuesto de la fórmula I. Los pro-fármacos son ésteres y amidas hidrolizables in vivo de un compuesto de la fórmula I. Pro-fármacos particulares considerados son ésteres y amidas de 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 hidroxí-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 hidroxí 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 es una amida formada a partir de un grupo amino presente dentro del grupo R del compuesto de fórmula general I según se define anteriormente, y el grupo carboxi de glicina, alanina o lisina.

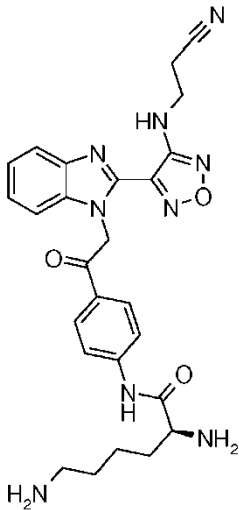
Incluso más preferiblemente, el compuesto de fórmula general I está en forma de un pro-fármaco seleccionado de los compuestos de fórmulas:



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



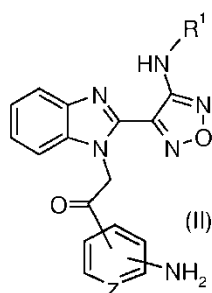
En una realización más especialmente preferida, el compuesto es



- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable, preferiblemente una sal hidrocloreuro, lo más preferiblemente una sal dihidrocloreuro.

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

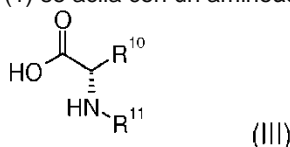
Estos pro-fármacos se pueden preparar mediante procedimientos que son conocidos per se, en particular, un procedimiento en el que un compuesto de fórmula (II)



(II)

en donde  $R^1$  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

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



en donde

$R^{10}$  se selecciona de hidrógeno (Gly); metilo (Ala) y aminobutilo protegido (Lys) y

$R^{11}$  es un grupo protector adecuado de amino, y

10 (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,

(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.

15 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

20 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'-d ciclohexil-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-aza-benzotriazol-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

30 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

35 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

40

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.

### Enfermedad

Los compuestos de fórmula general I han demostrado detener la proliferación celular e inducir la 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 se puede usar para el tratamiento profiláctico o especialmente terapéutico del cuerpo humano o animal, 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 anexiales 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, mesonefromas, 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 tal como se definen anteriormente 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 ampolloso y cicatricial, penfigoide gestacional, epidermólisis ampollosa adquirida, enfermedad de IgA lineal, liquen escleroso y atrófico, enfermedad de Duhring, 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.

Ejemplos de cánceres en términos de los órganos y partes del cuerpo afectadas incluyen, pero no se limitan al 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 pulmón de células grandes y mesotelioma), hueso, sistema endocrino, 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 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 de ovario, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de colon y cáncer de pulmón. De manera más especialmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de colon y cáncer de pulmón.

#### 45 Muestras

La medición de la concentración de BUBR1 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 normal, tejido tumoral, líneas celulares, sangre entera, suero, plasma, 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 p sangre. Más preferiblemente, la muestra se deriva de tejido tumoral o células tumorales circulantes. En una realización particularmente preferida, la muestra se deriva de tejido tumoral. Por ejemplo, la concentración de BUBR1 se puede medir en una muestra de tejido tumoral reciente, congelada o fijada en formalina/embebida en parafina.

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,

5 biopsia de núcleo o biopsia con aguja fina de aspiración, biopsia endoscópica o biopsia superficial. Una muestra de sangre 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

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

10 El biomarcador BUBR1 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.

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.

15 En una realización particularmente preferida, concentraciones reducidas de BUBR1 en la muestra con respecto a un valor estándar o conjunto de valores estándar predice resistencia. Tal como se utiliza en esta memoria, una disminución o concentraciones relativamente bajas o bajas o menores 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 una disminución de, o una concentración menor que, aproximadamente 1% con  
20 relación al estándar, preferiblemente una disminución de aproximadamente 5% con relación al estándar. Más preferiblemente, es una disminución de, o una concentración menor que, al menos aproximadamente 10% con relación al estándar. De manera más particularmente preferida, es una disminución de, o una concentración menor que, al menos aproximadamente 20% con relación al estándar. Por ejemplo, una disminución de, o una  
25 concentración menor 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 90% o aproximadamente 100% con respecto a la norma. Por lo tanto, una disminución incluye también la ausencia de BUBR1 detectable en la muestra.

Preferiblemente, concentraciones más bajas de BUBR1 en una muestra o muestras

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

ii) tomadas después del inicio del tratamiento y en comparación con una muestra o muestras tomadas del mismo sujeto antes de iniciar el tratamiento; o

35 iii) con relación a un valor estándar o un conjunto de valores estándares a partir de células o tejidos normales;

son predictivas de resistencia.

La medición de una concentración de BUBR1 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.

Más preferiblemente, concentraciones más bajas de BUBR1 en una muestra o muestras

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

ii) tomadas después del inicio del tratamiento y en comparación con una muestra o muestras tomadas del mismo sujeto antes de iniciar el tratamiento;

son predictivas de resistencia.

De manera especialmente preferida, concentraciones más bajas de BUBR1 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.

5 En una realización preferida, para el caso i) en el que la medición se compara en una muestra o muestras con respecto a un valor estándar o un conjunto de valores estándares a partir de muestras de sujetos con el mismo histotipo de tumor que la muestra a la que se ha de comparar, el valor estándar o conjunto de valores estándares se establece a partir de muestras de una población de sujetos con ese tipo de cáncer. Las muestras de estos sujetos estándares pueden derivarse, por ejemplo, del tejido tumoral o de células tumorales circulantes, siempre que el  
10 origen de la muestra sea consistente entre el patrón y la muestra a comparar.

En otra realización preferida, para el caso ii) en el que la medición se compara en una muestra o muestras tomadas después del inicio del tratamiento y en comparación con una muestra o muestras tomadas del mismo sujeto antes del inicio del tratamiento, se mide preferentemente para predecir la resistencia adquirida. Las muestras se comparan con células o tejido del mismo origen biológico. La predicción de la resistencia adquirida indicaría entonces que el  
15 tratamiento con el compuesto debería ser interrumpido. El biomarcador es así utilizado para controlar si es probable que el tratamiento adicional con el compuesto dé la respuesta requerida (p. ej., reducción de células anormales), o si las células se han convertido en no sensibles o resistentes a dicho tratamiento.

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

El valor estándar o conjunto de valores estándares se establece ex-vivo de las muestras pre-obtenidas, que puede ser de líneas celulares o, preferiblemente, de material biológico de al menos un sujeto y más preferiblemente de una  
25 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  
30 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  
35 tratamiento.

Por ejemplo, si se utiliza un método inmunohistoquímico para medir la concentración de BUBR1 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 BUBR1. El sistema también puede tener en cuenta la intensidad relativa de la tinción en las células individuales. Los valores estándares o el conjunto de  
40 valores estándares de la concentración de BUBR1 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.

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, preferiblemente 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, preferiblemente la actividad terapéutica del compuesto (p. ej., alta sensibilidad a baja sensibilidad), así como la resistencia a la actividad, preferiblemente la actividad terapéutica. Los datos de respuesta pueden ser monitoreados, por ejemplo, en términos de: tasas de respuesta objetiva, tiempo  
45 hasta la progresión de la enfermedad, progresión de la supervivencia libre y la supervivencia global.  
50



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,

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;

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;

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

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.

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.

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.

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.

## 20 BUBR1

Tal como se describe arriba, el término BUBR1 se utiliza para abarcar todos los sinónimos previamente mencionados y se refiere a esta entidad, tanto a las concentraciones de ácido nucleico como de proteínas, según sea apropiado. Concentraciones de ácidos nucleicos se refieren, por ejemplo, a ARNm, ADNc o ADN, y el término proteína incluye la secuencia de polipéptidos o proteínas traducida y las formas modificadas post-traducción de las mismas.

Un ejemplo preferido de la secuencia de proteínas de BUBR1 (BUBR1 humana) aparece en la SEQ. ID NO. 1, Figura 18. Sin embargo, el término BUBR1 también abarca homólogos, formas mutantes, variantes alélicas, variantes de corte y empalme, isotipos y equivalentes de esta secuencia. Preferiblemente, también abarca homólogos humanos, formas mutantes, variantes alélicas, isotipos, variantes de corte y empalme y equivalentes de esta secuencia. Más preferiblemente abarca secuencias que tienen al menos aproximadamente 75% de identidad, en especial preferiblemente al menos una identidad de aproximadamente 85%, con particular preferencia al menos aproximadamente 95% de identidad, y de manera más particularmente preferida de aproximadamente 99% de identidad, con dicha secuencia.

En una realización especialmente preferida, BUBR1 es la entidad en los niveles de ácido nucleico o proteínas, que se representa en la concentración de proteínas por la SEQ ID NO. 1 o secuencias que tienen una identidad de al menos el 95% con esta secuencia, preferentemente una identidad de al menos 99%. En una realización particularmente preferida, BUBR1 está representada por SEQ. ID NO.1.

Un ejemplo preferido de la secuencia de ácidos nucleicos de BUBR1 (BUBR1 humana) es accesible a través de la Secuencia de Referencia NM\_001211 de NCBI, y aparece en SEQ. ID NO 2 (NM\_001211.5), Figura 19. El término BUBR1 también abarca modificaciones, variantes más degeneradas de dicha secuencia, complementos de dicha secuencia 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 al menos aproximadamente 75% de identidad con dicha secuencia, de manera especialmente preferida al menos una identidad de aproximadamente 85%, de manera particularmente preferible al menos una identidad de aproximadamente 95% y de manera más particularmente preferida una identidad de aproximadamente 99%.

En aún otra realización preferida, BUBR1 es la entidad en los niveles de ácido nucleicos o proteínas, que está representado en la concentración de ácido nucleico por SEQ ID NO. 2 o secuencias que tienen una identidad de al menos el 95% con esta secuencia, preferentemente una identidad de al menos 99%. En una realización particularmente preferida, BUBR1 está representado por SEQ. ID. NO. 2.

## Concentración de BUBR1

La concentración de BUBR1 puede someterse a ensayo en la muestra mediante técnicas de análisis de proteínas bien conocidas para una persona experta. Puede someterse a ensayo al nivel de la transcripción o la traducción.

5 En una realización preferida, se mide el nivel de ácidos nucleicos de BUBR1, preferiblemente ARNm de BUBR1 en una muestra. Ejemplos de métodos del análisis de la expresión génica, conocidos en la técnica, que son adecuados para medir la concentración de BUBR1 al nivel de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a i) utilizar una sonda marcada que es capaz de hibridarse a ARNm; ii) utilizar PCR que implica uno o más cebadores basados en la secuencia génica de BUBR1, por ejemplo utilizando métodos cuantitativos de PCR con sondas marcadas, p. ej., sondas fluorogénicas tal como PCR cuantitativa en tiempo real; 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.

15 En una realización preferida, se mide la concentración de BUBR1 al nivel de proteínas. Ejemplos de métodos del análisis de la expresión de proteínas conocidos en la técnica que son adecuados para medir la concentración de BUBR1 al nivel de proteínas incluyen, pero no se limitan a i) análisis de inmunohistoquímica (IHC), ii) transferencia western iii) inmunoprecipitación, iv) ensayo de inmunosorbente 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 potenciada por láser de superficie (SELDI, p. ej., SELDI-TOF).

20 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 BUBR1 están disponibles comercialmente de BD Transduction Laboratories y Cell Signaling Technology, Inc., o se pueden preparar a través de métodos convencionales de generación de anticuerpos, bien conocidos para una persona experta.

25 Métodos preferidos de análisis de proteínas son ELISA, técnicas de espectrometría de masas, inmunohistoquímica y transferencia western, más preferiblemente 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 proteína, y se puede cuantificar, por ejemplo, mediante densitometría.

30 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.

35 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

45 En una realización preferida, el biomarcador se utiliza 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.

En otra realización preferida, el biomarcador se utiliza para predecir la resistencia adquirida de la enfermedad en un sujeto al compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente.

50 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 o a continuar respondiendo o a no continuar respondiendo 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 menor concentración de BUBR1, 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.

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 ha de administrar en combinación con una terapia dirigida, terapia endocrina, radioterapia, inmunoterapia o intervención quirúrgica, o una combinación de estos.

BUBR1 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

En un método de tratamiento y en BUBR1 para uso en un método de tratamiento, la concentración de BUBR1 se establece primero en relación con una concentración estándar o conjunto de concentraciones estándares o concentraciones de inicio de pre-tratamiento 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 BUBR1 en dicha muestra no es menor que un valor estándar o un conjunto de valores estándares o no ha disminuido en relación con las concentraciones de inicio del pre-tratamiento, respectivamente. 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 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 µm. 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 BUBR1 en un sujeto que tiene una muestra con una menor concentración de BUBR1 en comparación con una concentración estándar o un conjunto de concentraciones estándares o concentraciones de inicio del pre-tratamiento, 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 BUBR1 puede ser incrementada por medios químicos o genéticos directos o indirectos. Ejemplos de tales métodos son el tratamiento con un fármaco que resulta en una expresión incrementada de BUBR1, la administración dirigida de construcciones virales, de plásmidos o de péptidos, o anticuerpo o ARNip o anti-sentido para regular al alza la concentración de BUBR1. Por ejemplo, construcciones virales o de plásmidos se pueden utilizar para incrementar la expresión de BUBR1 en la célula. El sujeto puede entonces ser tratado con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 Un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo puede 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.

10 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

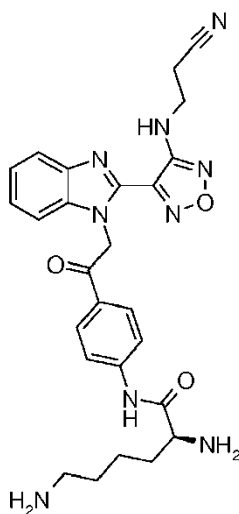
15 En un aspecto, la invención se refiere a un kit para predecir la respuesta, preferiblemente de una enfermedad en un sujeto, a un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente, que comprende los reactivos necesarios para medir la concentración de BUBR1 en una muestra. Preferiblemente, los reactivos comprenden un reactivo de captura que comprende un detector para BUBR1 y un reactivo detector.

20 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 BUBR1 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.

30 Los reactivos son preferiblemente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen selectivamente a BUBR1. Estos pueden estar, por ejemplo, en forma de un anticuerpo primario específico que se une a BUBR1 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 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.

35 En otra realización preferida, los reactivos también pueden ser los que son capaces de medir el nivel de ácidos nucleicos de BUBR1 en una muestra. Muestras adecuadas son muestras de tejidos o de tejidos tumorales, secciones de muestras de tejidos o de tejidos tumorales embebidas en parafina o congeladas, células tumorales circulantes y muestras de sangre y derivadas de fluidos corporales. Preferiblemente, los reactivos comprenden una sonda o cebadores marcados para la hibridación al ácido nucleico de BUBR1 en la muestra. Sistemas de detección adecuados, ya sea basadas en técnicas de amplificación por PCR o detección de sondas marcadas, permiten la cuantificación de ácido nucleico de BUBR1 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 de tumores, tejidos o derivadas de la sangre, en donde los reactivos adecuados enriquecen selectivamente los ácidos nucleicos. Los kits permiten la medición y cuantificación de i) la cantidad de sondas marcadas hibridadas a las muestras in situ o ii) la cantidad de amplificación basada en cebadores por métodos basados en propiedades físico-químicas específicas de las propias sondas o los informadores fijados a los cebadores.

45 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 es una sal dihidrocloruro. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit de este tipo tal como se describió anteriormente.

- 5 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

- 10 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, 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 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.

#### 25 Transfección de ARNip

- Con el fin de mostrar que BUBR1 es un biomarcador de resistencia, se realizaron experimentos de ARNip. Para los experimentos de ARNip para evaluar los efectos sobre el fenotipo de las células tumorales y los números (Figura 8), células de cáncer cervical HeLa (ATCC referencia CCL-2) se cultivaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en DMEM con FCS al 10% (Invitrogen). 1000 células HeLa por pocillo fueron sembradas en placas de multi-titulación negras de 384 pocillos (BD Falcon). Las células fueron transfectadas inversamente con ARNip control no fijador de objetivo 20 nM (agrupación no fijadora de objetivo ON-Target-plus D001810, Dharmacon) o una mezcla de cuatro ARNip de BUBR1 (ON-Target-plus Smartpool L-004101, Dharmacon, véase la información de la secuencia más adelante) utilizando reactivo de transfección Dharmafect1 (Dharmacon, Thermo). 48 horas después de la siembra de células y de la transfección de ARNip, un par duplicado de clones de ARNip fue tratado con BAL27862 (50 nM, DMSO al 0,1%) y otro par duplicado con disolución control (DMSO al 0,1%) durante 24 horas. El experimento se terminó mediante la fijación basada en metanol (-20°C, 5 min) y posterior inmunotinción (1 hora, temperatura ambiente) utilizando

anticuerpos de alfa-tubulina (marcados con FITC, 1:500, F2168, Sigma) y actina (TRITC-faloidina, 1:3000, P1951, Sigma), así como tinción con ADN de Hoe33342 (1:8000, Sigma). Basado en la inmunotinción, se analizó la morfología de las células tratadas utilizando un enfoque multiparamétrico (microscopio de fluorescencia BD Pathway 855; objetivo 20x) con el software apropiado. El número de células por pocillo también se calculó basándose en la tinción de los núcleos con Hoe33342. Esto permitió el cálculo de la fracción de células que muestran un fenotipo sin tratar (normal) (en %).

Para los experimentos de ARNip para evaluar los efectos sobre los niveles de expresión de BUBR1 mediante inmunotransferencia y efectos sobre la proliferación de células tumorales y la viabilidad utilizando el ensayo de YO-PRO (Figuras 7, 9, 10 y 11), y el Ensayo de Cristal Violeta (Figuras 12 y 13), las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad apropiada: HeLa (células de cáncer cervical; ATCC referencia CCL-2)  $2.5E + 04$  (para YO-PRO) o  $4.0E+04$  (para Cristal Violeta) células por pocillo, H460 (células NSCLC; ATCC referencia HTB-177)  $5.0E+04$  células por pocillo, MCF-7 (células de carcinoma de mama; ATCC referencia HTB-22)  $2.4E+05$  células por pocillo, Panc1 (células de cáncer pancreático, ATCC referencia CRL-1469) y HCT116 (células de cáncer de colon, ATCC referencia CCI-247)  $8E+04$  células por pocillo, y se cultivaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  en RPMI-1640 o DMEM que contiene FCS al 10% (medio completo). Las células fueron transfectadas al día siguiente con una mezcla de cuatro ARNip de BUBR1 (ON-Target-plus Smartpool L-004101, Dharmacon, véase la información de la secuencia más adelante), los cuatro ARNip individuales de BUBR1 (Conjunto ON-Target-plus de cuatro LU-004101 mejorados) o ARNip de control no fijadores de objetivo (agrupación no fijadora de objetivo ON-Target-plus D001810, Dharmacon), utilizando Hiperfect (Qiagen) para H460, Panc1 y HCT116 o Lipofectamine2000 (Invitrogen) para HeLa y MCF-7 según las instrucciones del fabricante. La concentración final de ARNip era 10 nM (H460) o 20-30 nM (HeLa) o 20 nM (MCF-7, Panc1, HCT116). Las células se mantuvieron a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas antes de tratamiento con compuesto durante 48 horas, seguido de análisis YO-PRO, Ensayo de Cristal Violeta o extracción para el ensayo de inmunotransferencia. Los ARNip ON-Target-plus son ARNip de doble cadena, modificados químicamente para mejorar la especificidad para la diana deseada.

Las secuencias de los cuatro ARNip de BUBR1 utilizados eran:

ARNip de BUBR1 ON-TARGETplus nº 1 SEQ ID. NO 3

5' GAUGGUGAAUUGUGGAAUA

ARNip de BUBR1 ON-TARGETplus nº 2 SEQ ID. NO 4

5' GAAACGGGCAUUUGAAUAU

ARNip de BUBR1 ON-TARGETplus nº 3 SEQ ID. NO 5

5' GCAAUGAGCCUUUGGAUAU

ARNip de BUBR1 ON-TARGETplus nº 4 SEQ ID. NO 6

5' CAAUACAGCUUCACUGAUA

#### Ensayo YO-PRO de Células tratadas con ARNip

BAL27862, disuelto en DMSO, se diluyó en medio completo antes de la adición a las células a las concentraciones indicadas (concentración final de DMSO 0,5%). Las células se incubaron durante 48 horas, seguido de análisis de YO-PRO.

Yoduro de YO-PRO<sup>®</sup>-1 es un colorante de ácido nucleico, de cianina monomérica, fluorescente, impermeable de la membrana, que permite el análisis de células moribundas (p. ej., apoptóticas) sin interferir en la viabilidad celular.

12,5  $\mu\text{l}$  de yoduro de YO-PRO<sup>®</sup>-1 (491/509) (Invitrogen/Molecular Probes, nº Y-3603; 1 mM en DMSO) se añadieron a 1 ml de tampón YO-PRO 5 veces concentrado (citrate de Na 100 mM, pH 4,0; NaCl 134 mM) para producir la YO-PRO Mix. Para la determinación de la citotoxicidad/apoptosis, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de YO-PRO Mix por pocillo en placas de 6 pocillos (dilución 1:5), y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad. La

absorción de colorante YO-PRO en células se evaluó mediante el uso de un lector de placas SpectraMax M2<sup>e</sup> (Molecular Devices) utilizando excitación a 485 nm y emisión a 538 nm en un punto de corte de 530 nm. Para la determinación de los efectos globales sobre el crecimiento celular/número total de células, 500 µl de tampón de lisis (EDTA 30 mM, EGTA 30 mM; NP-40 al 0,6%, en 0,33 veces de tampón YO-PRO) se añadieron por pocillo y se incubó durante 30 min a la temperatura ambiente en la oscuridad. La lectura fluorescente se realizó en un lector de placas SpectraMax M2<sup>e</sup> (Molecular Devices) utilizando a 485 nm y emisión a 538 nm en un punto de corte de 530 nm. El % de células muertas se calculó como un porcentaje del número total de células restante.

#### Ensayo de Cristal Violeta de Células tratadas con ARNip

Células se incubaron durante 48 horas con DMSO o BAL27862 diluidas en medio completo (concentración final de DMSO 0,5%). Después de separar medio, las células se fijaron y tiñeron mediante la adición de 1 ml de Tinción de Cristal Violeta (0,2% de Cristal Violeta en Metanol al 50%) por pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente. Posteriormente, el colorante se decantó y las placas se lavaron 4 veces con agua bidestilada. Las placas se secaron al aire durante varias horas. El colorante se disolvió mediante la adición de 2 ml de tampón (Tris 0,1 M pH 7,5, SDS al 0,2%, Etanol al 20%) por pocillo y agitando las placas. La absorbancia a 590 nm se midió utilizando un lector de placas SpectraMax M2<sup>e</sup> (Molecular Devices). Con el fin de restar el número de células de partida, se fijó una placa de control y se tiñó el mismo día que se añadió el compuesto. Los resultados finales se calcularon restando la absorbancia de células a partir de la del control (DMSO) o células tratadas con compuestos. Los valores inferiores a cero indican la muerte celular.

#### Ensayo del Brote de Colonias:

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). 2,0E+04-6,0E+04 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).

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.

#### PCR en Tiempo real Cuantitativa

Células HeLa de cáncer cervical y H460 NSCLC (número de referencia ATCC HTB-177) fueron cultivadas en placas de 10 cm hasta que alcanzaron un 80% de confluencia, 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 paso RNA-to-Ct TaqMan (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 Hs01084828\_m1 para la cuantificación de BUBR1 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 BUBR1 se normalizaron a ARN 18S.

#### Generación y Ensayo de Cristal Violeta de Líneas Celulares Resistentes a BAL27862

Sub-líneas resistentes a BAL27862 de líneas de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano (H460 referencia ATCC HTB-177; A549 referencia ATCC CCL-185), de cáncer de ovario (SKOV3 referencia ATCC HTB-77) fueron generadas mediante selección a largo plazo en medio de cultivo celular completa (RPMI-1640 que contiene FCS al 10%; Sigma-Aldrich) mediante concentraciones crecientes de BAL27862. Dependiendo de la línea celular, el proceso de selección se llevó a cabo durante 8-12 meses con el fin de lograr factores de resistencia (relación de CI<sub>50</sub> de la línea celular resistente y la línea celular de tipo salvaje correspondiente) entre 3 y 11,6. Las sub-líneas resistentes se expandieron a la concentración más alta tolerada de BAL27862 y posteriormente se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido.



Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a las siguientes densidades: A549: 2000, H460: 1000, SKOV3: 2000 y, después de 24 horas de incubación, se incubaron durante 72 horas con DMSO, BAL27862, colchicina, nocodazol, paclitaxel o vinblastina diluidos en medio completo (concentración final de DMSO máx. 0,5%). Después se retiró el medio, las células se fijaron y tiñeron mediante la adición de 50 µl de Tinción de Cristal Violeta (0,2% de Cristal Violeta en metanol al 50%) por pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la mancha se decantó y las placas se lavaron 4 veces con agua bidestilada. Las placas se secaron al aire durante varias horas. La mancha se disolvió mediante la adición de 100 µl de tampón (Tris 0,1 M pH 7,5, SDS al 0,2%, etanol al 20%) por pocillo y agitando las placas. La absorbancia a 590 nm se midió utilizando un lector de placas SpectraMax M2e (Molecular Devices). Valores  $CI_{50}$  anti-proliferativos se calcularon a partir de curvas de concentración-respuesta utilizando el software GraphPad Prism. Los factores de resistencia se calcularon como una relación de BAL27862  $CI_{50}$  en la variante de la línea resistente frente a la  $CI_{50}$  en la línea parental.

#### Extracción de Proteínas

Extracción de células tumorales: Las células se lavaron con PBS enfriado con hielo que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y con 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, pirofosfato 15 mM, ortovanadato de sodio 2 mM, molibdato de sodio 10 mM, leupeptina (10 µg/mL), aprotinina (10 µg/mL) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM. Las células se extrajeron en el mismo tampón que contenía NP-40 al 1%. Después de la homogeneización, los lisados se clarificaron por centrifugación y se congelaron a -80°C.

#### Inmunotransferencia/Transferencia Western

La inmunotransferencia se realizó utilizando 20 µg de proteína total por pista. La concentración total de proteína se determinó con el ensayo de proteínas BCA (Pierce). La proteína se separó en un gel de SDS al 10% 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:

Ac. BUBR1 N° 1: BUBR1<sub>CS</sub> (disponible de Cell Signaling Technology, Inc, número de referencia 4116) origen: conejo, policlonal, dilución 1:1000, condiciones del tampón: 5% de leche en PBS/Tween al 0,1%

Ac. BUBR1 N° 2: BUBR1<sub>BD</sub> (disponible de BD Transduction Laboratories, número de referencia 612502) origen: conejo, monoclonal, dilución 1:5000, condiciones del tampón: BSA al 3% en PBS/Tween al 0,1%

Alfa-tubulina: (disponible de Sigma, número de referencia T5168) origen: ratón, monoclonal, dilución 1:10000, condiciones del tampón: leche al 5% en PBS/Tween al 0,1%

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%

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:

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

5

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:

10

Especificación de anticuerpos	Procesamiento
Anti-BubR1, BD Transduction Lab, nº 612503, Amc de ratón	Acondicionamiento celular 1 tampón de Roche durante 30 minutos, incubación de anticuerpos a 37°C durante 32 minutos, a una dilución de 1:200

### Ejemplos detallados

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

15 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 distinto 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).

20

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

25 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.

30

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.

35

### Ejemplos detallados de acuerdo con la invención

Ejemplo 3: Regulación a la Baja mediada por ARNip de la Expresión de BUBR1 Suprime la Expresión del Efecto Antiproliferativo y la Muerte de Células Tumorales Inducida por tratamiento con BAL27862

A través del análisis de inmunotransferencia (utilizando tanto los Ac BUBR1 N° 1 y 2.) la regulación a la baja de la expresión de BUBR1 utilizando una agrupación de cuatro ARNip de BUBR1 ha demostrado ser muy eficaz en líneas de células HeLa de tumor cervical como H460 de NSCLC (Figura 7).

5 Sorprendentemente, el análisis de los efectos de tratamiento de ARNip de BUBR1 agrupado en el número de células HeLa y la fracción de células HeLa con un fenotipo normal en presencia de BAL27862 indicó que se requería BULBR1 para efectos óptimos (Figura 8). Un análisis más detallado de los efectos de la expresión reducida de BUBR1 sobre la proliferación de células HeLa y la viabilidad utilizando el ensayo YO-PRO, indicó que, a pesar de la pérdida de expresión de BUBR1, sí provocó una ligera reducción en la tasa de proliferación, el efecto antiproliferativo de BAL27862 se redujo drásticamente (Figura 9, panel superior). Además, no se observó un aumento en la muerte de células tumorales, en comparación con un cierto número de controles tratados con BAL27862 (Figura 9, panel inferior).

15 Este efecto ha demostrado no ser específico para la línea celular o para el tipo de tumor, ya que se hizo la misma observación después de tratamiento de células H460 (Figura 10) y las células de cáncer de mama MCF7 (Figura 11). Además, utilizando un método alternativo para analizar la proliferación celular (ensayo de Cristal Violeta), los mismos efectos se observaron de nuevo en células HeLa, así como de cáncer pancreático (Panc1) y de colon (HCT116) (Figura 12).

20 Con el fin de controlar la especificidad de la agrupación de ARNip de BUBR1 utilizado para los experimentos presentados en las Figs. 7-12, también se evaluaron los ARNip individuales contenidos dentro de la agrupación. El tratamiento con todos los ARNip individuales disminuyó el efecto de BAL27862 sobre la proliferación celular (tal como se evaluó mediante el ensayo de Cristal Violeta) (Figura 13A). Es importante destacar que el grado de reducción se correlacionaba con la eficiencia de la regulación a la baja de la proteína BUBR1 provocada por cada uno de los ARNip individuales (compárese la Figura 13A con 13B).

Ejemplo 4: Regulación a la baja de la Expresión de BUBR1 se Observa en Líneas Tumorales Seleccionadas para la Resistencia a BAL27862

25 La selección *in vitro* para la resistencia a BAL27862 resultó en la generación de 3 líneas celulares de tumor relativamente resistentes, con los siguientes factores de resistencia frente a las líneas parentales (basado en las determinaciones de  $CI_{50}$  utilizando el ensayo de Cristal Violeta): A549 (3,0 veces); SKOV3 resistente 1 (7,6 veces); SKOV3 resistente 2 (11,6 veces); H460 (5,3 veces) (Tabla 1).

Tabla 1:

Compuesto de tratamiento	Factores de resistencia (relación de $CI_{50}$ de la variante de línea celular resistente a BAL27862 y la $CI_{50}$ de la línea celular parental)			
	A549	H460	SKOV3 resistente 1	SKOV3 resistente 2
BAL27862	3,0	5,3	7,6	11,6
Colchicina	0,9	1,6	2,0	2,8
Nocodazol	1,6	1,3	3,6	3,9
Vinblastina	2,3	4,6	15,7	17,8
Paclitaxel	0,06	0,3	0,4	0,5

30 En general estas células resistentes a BAL27862 exhibieron un nivel diferente de respuesta a otros agentes desestabilizantes de microtúbulos tales como colchicina, nocodazol y vinblastina, en comparación con BAL27862; y, de hecho, se observó una sensibilidad incrementada al estabilizador de microtúbulos paclitaxel en todas las líneas (Tabla 1).

35 La extracción y el análisis de inmunotransferencia de estas líneas (con Ac de BUBR1 N° 2, monoclonal de ratón) indicaron una expresión reducida de la proteína BUBR1 en comparación con la línea parental (Figura 14). Esto se mantuvo durante todo el desarrollo de resistencia en las células SKOV3 (Figura 15). Estos datos demuestran la asociación de la reducción de los niveles de expresión de BUBR1 con resistencia adquirida a BAL27862.

Ejemplo 5: Asociación de bajos niveles de expresión de BUBR1 con células tumorales derivadas de pacientes resistentes al tratamiento con BAL27862.

Sobre la base de ensayos del brote de colonias, el uso de células tumorales derivadas de tumores derivados de pacientes mantenidos como xenoinjertos en ratones, las células tumorales sensibles o relativamente resistentes a BAL27862 se identificaron a partir de cáncer gástrico y de pulmón (véase la Tabla 2). Concentraciones a las que se observó una inhibición del crecimiento del 70% frente a los controles ( $CI_{70}$ ) se muestran en la Tabla 2. En esta tabla, las células tumorales sensibles a BAL27862 tienen valores  $CI_{70}$  en el intervalo nanomolar bajo, mientras que las células tumorales resistentes a BAL27862 se definen por valores de  $CI_{70} > 600$  nanomolar. Los datos de paclitaxel y vinblastina, utilizando el mismo ensayo *ex vivo*, también estaban disponibles para todos los modelos de tumores. Todos eran resistentes al tratamiento con paclitaxel, mientras que todos eran sensibles al tratamiento con vinblastina.

10 Tabla 2:

Tipo de tumor		Sensible (S) / Resistente (R)		
		BAL27862	Paclitaxel	Vinblastina
Gástrico	GXF251	S	R	S
	GXF97	R	R	S
Pulmón	LXFL529	S	R	S
	LXFA629	R	R	S

El análisis de la inmunohistoquímica se realizó con el fin de medir la expresión de proteínas BUBR1 en células tumorales en los mismos tumores mantenidos como xenoinjertos. Análisis de las concentraciones de BUBR1 en tumores enteros indicó que las concentraciones de BUBR1 variaron entre los diferentes tumores (Figura 16).

Basado en el ensayo del brote de colonias y los mismos criterios de  $CI_{70}$ , no hubo asociación entre resistencia a paclitaxel o vinblastina y los bajos niveles de expresión de BUBR1. Esto es evidente, ya que para el tipo de tumor gástrico, ambos modelos eran resistentes a paclitaxel y, sin embargo, para GXF 97 los niveles de BUBR1 eran mucho más bajos que en GXF 251. La misma falta de asociación era cierta para el alcaloide de la vinca, vinblastina en el modelo gástrico, ya que estos dos tumores eran sensibles a vinblastina. Esta falta de asociación se repitió en los modelos de tumores de pulmón. Por lo tanto, los niveles de BUBR1 demostraron ser inadecuados como un biomarcador fiable de la resistencia a los agentes de microtúbulos convencionales paclitaxel y vinblastina en modelos de tumores derivados del paciente.

Sorprendentemente, por el contrario, cuando los datos de resistencia a BAL27862, tal como se define por el ensayo del brote de colonias, se compararon con el nivel de BUBR1, la expresión de BUBR1 ha demostrado ser inferior sólo en los tumores resistentes y no en los tumores sensibles derivados del mismo histotipo de tumor (compárese la Figura 16 con la Tabla 2). Niveles bajos de BUBR1 eran, por lo tanto, consistentemente indicativos de resistencia a BAL2786. Por lo tanto, se demostró que los niveles de BUBR1 eran un biomarcador de la resistencia para el compuesto BAL27862.

Ejemplo 6: ARN de BUBR1 frente a los niveles de expresión de proteínas.

Con el fin de demostrar que los niveles de expresión de ARN de BUBR1 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 la resistencia a BAL27862, los niveles de expresión se midieron en los niveles tanto del ARN como de proteínas de la siguiente manera. Extractos de proteínas de células enteras se prepararon a partir de líneas celulares HeLa y H460 y se analizaron por inmunotransferencia en cuanto a la expresión de proteínas BUBR1 (Figura 17B). Muestras de ARN se prepararon a partir del mismo pasaje de células y se llevó a cabo una RT-PCR cuantitativa (Figura 17A). La comparación de los datos de inmunotransferencia (Figura 17B) y los datos de RT-PCR (Figura 17A) indicó que había una buena correlación entre los niveles de proteína y de expresión de ARN para BUBR1 en estas líneas.

Lista de abreviaturas

- A549 línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humana
- BCA ácido bicinconínico
- 40 Bcl-2 linfoma de células B de proteína 2
- BRCA1 proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 1
- BrdU bromodesoxiuridina

	BSA	albúmina de suero bovino
	CCD	dispositivo cargado-acoplado
	ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
	CA-125	antígeno de cáncer 125
5	CREST	síndrome de esclerodermia limitada
	DAB	3,3-diaminobencidina
	DMSO	dimetilsulfóxido
	DMEM	medio esencial modificado por Dulbecco
	ADN	ácido desoxirribonucleico
10	dUTP	2'-desoxiuridina 5'-trifosfato
	EDTA/EGTA	tetraacetato de etilendiamina/bis(β-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacetato de etilenglicol
	ELISA	ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas
	ErbB-2	receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
	EtOH	Etanol
15	FACS	exploración/clasificación de células activadas por fluorescencia
	FCS/FBS	suero de ternera fetal / bovino fetal
	G2/M	transición de G2 a la fase mitótica del ciclo celular
	GXF 251	cáncer gástrico derivado del paciente
	GXF 97	cáncer gástrico derivado del paciente
20	HCT116	línea celular de carcinoma colorrectal humana
	HeLa	línea celular de cáncer de células escamosas humana
	HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
	Hoe33342	trihidrocloruro de 2'-(4'-etoxifenil)-5-(4-metil-piperazin-1-il)-2,5'-bis-1H-bencimidazol trihidrato
	H460	línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humana
25	IgA	inmunoglobulina A
	IgG	inmunoglobulina G
	IHC	inmunohistoquímica
	ISET	aislamiento por tamaño de células tumorales epiteliales
	LXFA 629	células de carcinoma de pulmón derivadas del paciente
30	LXFL 529	células de carcinoma de pulmón derivadas del paciente
	MALDI	espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz
	MALDI-TOF	espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz-tiempo-de-vuelo
	MCF-7	línea celular de carcinoma de mama humana
35	ARNm	ácido ribonucleico mensajero
	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
40	NSCLC	cáncer de pulmón de células no pequeñas
	NP40	Nonidet P40
	NTC	control sin molde
	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
45	P-gp	glicoproteína P
	PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
	PSA	antígeno específico de la próstata
	PVDF	poli(fluoruro de vinilideno)
	RANO	evaluación de la respuesta para gliomas de alto grado
50	RECIST	criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos
	READS	amplificación por enzima de restricción de ADNc digeridos
	RPMI-1640	medio de cultivo celular utilizado para el cultivo de células eucarióticas y líneas celulares transformadas y no transformadas
	RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
55	SAGE	análisis en serie de la expresión génica
	SDS	dodecilsulfato de sodio
	SELDI	desorción/ionización potenciada por láser de superficie
	SELDI-TOF	desorción/ionización potenciada por láser de superficie-tiempo de vuelo
	SEQ. ID NO.	número de identificación de la secuencia
60	ARNip	ácido ribonucleico inhibidor pequeño
	SKBR3	línea celular de carcinoma mamario humana

	SKOV3	línea celular de carcinoma de ovario humana
	TUNEL	ensayo de marcaje de extremo de corte de dUTP mediado por desoxinucleotidil-transferasa terminal
	TX-100	Triton-X100
5	YO-PRO	colorante de ácidos nucleicos de cianina monomérica, fluorescente

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	Basilea Pharmaceutica AG
	<120>	Uso de BUBR1 como un biomarcador de respuesta a fármacos
10	<130>	P50415EP00
	<160>	6
	<170>	PatentIn version 3.4
	<210>	1
	<211>	1050
15	<212>	PRT
	<213>	Homo sapiens
	<400>	1

ES 2 620 582 T3

Met Ala Ala Val Lys Lys Glu Gly Gly Ala Leu Ser Glu Ala Met Ser  
 1 5 10 15

Leu Glu Gly Asp Glu Trp Glu Leu Ser Lys Glu Asn Val Gln Pro Leu  
 20 25 30

Arg Gln Gly Arg Ile Met Ser Thr Leu Gln Gly Ala Leu Ala Gln Glu  
 35 40 45

Ser Ala Cys Asn Asn Thr Leu Gln Gln Gln Lys Arg Ala Phe Glu Tyr  
 50 55 60

Glu Ile Arg Phe Tyr Thr Gly Asn Asp Pro Leu Asp Val Trp Asp Arg  
 65 70 75 80

Tyr Ile Ser Trp Thr Glu Gln Asn Tyr Pro Gln Gly Gly Lys Glu Ser  
 85 90 95

Asn Met Ser Thr Leu Leu Glu Arg Ala Val Glu Ala Leu Gln Gly Glu  
 100 105 110

Lys Arg Tyr Tyr Ser Asp Pro Arg Phe Leu Asn Leu Trp Leu Lys Leu  
 115 120 125

Gly Arg Leu Cys Asn Glu Pro Leu Asp Met Tyr Ser Tyr Leu His Asn  
 130 135 140

Gln Gly Ile Gly Val Ser Leu Ala Gln Phe Tyr Ile Ser Trp Ala Glu  
 145 150 155 160

Glu Tyr Glu Ala Arg Glu Asn Phe Arg Lys Ala Asp Ala Ile Phe Gln  
 165 170 175

ES 2 620 582 T3

Glu Gly Ile Gln Gln Lys Ala Glu Pro Leu Glu Arg Leu Gln Ser Gln  
 180 185 190

His Arg Gln Phe Gln Ala Arg Val Ser Arg Gln Thr Leu Leu Ala Leu  
 195 200 205

Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Val Phe Glu Ser Ser Val Pro Gln Arg  
 210 215 220

Ser Thr Leu Ala Glu Leu Lys Ser Lys Gly Lys Lys Thr Ala Arg Ala  
 225 230 235 240

Pro Ile Ile Arg Val Gly Gly Ala Leu Lys Ala Pro Ser Gln Asn Arg  
 245 250 255

Gly Leu Gln Asn Pro Phe Pro Gln Gln Met Gln Asn Asn Ser Arg Ile  
 260 265 270

Thr Val Phe Asp Glu Asn Ala Asp Glu Ala Ser Thr Ala Glu Leu Ser  
 275 280 285

Lys Pro Thr Val Gln Pro Trp Ile Ala Pro Pro Met Pro Arg Ala Lys  
 290 295 300

Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Trp Asn Thr Gly Arg Ser Leu Glu  
 305 310 315 320

His Arg Pro Arg Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ile Ala Val Pro Ala Val  
 325 330 335

Leu Pro Ser Phe Thr Pro Tyr Val Glu Glu Thr Ala Gln Gln Pro Val  
 340 345 350

Met Thr Pro Cys Lys Ile Glu Pro Ser Ile Asn His Ile Leu Ser Thr  
 355 360 365

Arg Lys Pro Gly Lys Glu Glu Gly Asp Pro Leu Gln Arg Val Gln Ser  
 370 375 380

His Gln Gln Ala Ser Glu Glu Lys Lys Glu Lys Met Met Tyr Cys Lys  
 385 390 395 400

Glu Lys Ile Tyr Ala Gly Val Gly Glu Phe Ser Phe Glu Glu Ile Arg  
 405 410 415

Ala Glu Val Phe Arg Lys Lys Leu Lys Glu Gln Arg Glu Ala Glu Leu  
 420 425 430



ES 2 620 582 T3

Leu Thr Ser Ala Glu Lys Arg Ala Glu Met Gln Lys Gln Ile Glu Glu  
 435 440 445  
 Met Glu Lys Lys Leu Lys Glu Ile Gln Thr Thr Gln Gln Glu Arg Thr  
 450 455 460  
 Gly Asp Gln Gln Glu Glu Thr Met Pro Thr Lys Glu Thr Thr Lys Leu  
 465 470 475 480  
 Gln Ile Ala Ser Glu Ser Gln Lys Ile Pro Gly Met Thr Leu Ser Ser  
 485 490 495  
 Ser Val Cys Gln Val Asn Cys Cys Ala Arg Glu Thr Ser Leu Ala Glu  
 500 505 510  
 Asn Ile Trp Gln Glu Gln Pro His Ser Lys Gly Pro Ser Val Pro Phe  
 515 520 525  
 Ser Ile Phe Asp Glu Phe Leu Leu Ser Glu Lys Lys Asn Lys Ser Pro  
 530 535 540  
 Pro Ala Asp Pro Pro Arg Val Leu Ala Gln Arg Arg Pro Leu Ala Val  
 545 550 555 560  
 Leu Lys Thr Ser Glu Ser Ile Thr Ser Asn Glu Asp Val Ser Pro Asp  
 565 570 575  
 Val Cys Asp Glu Phe Thr Gly Ile Glu Pro Leu Ser Glu Asp Ala Ile  
 580 585 590  
 Ile Thr Gly Phe Arg Asn Val Thr Ile Cys Pro Asn Pro Glu Asp Thr  
 595 600 605  
 Cys Asp Phe Ala Arg Ala Ala Arg Phe Val Ser Thr Pro Phe His Glu  
 610 615 620  
 Ile Met Ser Leu Lys Asp Leu Pro Ser Asp Pro Glu Arg Leu Leu Pro  
 625 630 635 640  
 Glu Glu Asp Leu Asp Val Lys Thr Ser Glu Asp Gln Gln Thr Ala Cys  
 645 650 655  
 Gly Thr Ile Tyr Ser Gln Thr Leu Ser Ile Lys Lys Leu Ser Pro Ile  
 660 665 670  
 Ile Glu Asp Ser Arg Glu Ala Thr His Ser Ser Gly Phe Ser Gly Ser  
 675 680 685

ES 2 620 582 T3

Ser Ala Ser Val Ala Ser Thr Ser Ser Ile Lys Cys Leu Gln Ile Pro  
690 695 700

Glu Lys Leu Glu Leu Thr Asn Glu Thr Ser Glu Asn Pro Thr Gln Ser  
705 710 715 720

Pro Trp Cys Ser Gln Tyr Arg Arg Gln Leu Leu Lys Ser Leu Pro Glu  
725 730 735

Leu Ser Ala Ser Ala Glu Leu Cys Ile Glu Asp Arg Pro Met Pro Lys  
740 745 750

Leu Glu Ile Glu Lys Glu Ile Glu Leu Gly Asn Glu Asp Tyr Cys Ile  
755 760 765

Lys Arg Glu Tyr Leu Ile Cys Glu Asp Tyr Lys Leu Phe Trp Val Ala  
770 775 780

Pro Arg Asn Ser Ala Glu Leu Thr Val Ile Lys Val Ser Ser Gln Pro  
785 790 795 800

Val Pro Trp Asp Phe Tyr Ile Asn Leu Lys Leu Lys Glu Arg Leu Asn  
805 810 815

Glu Asp Phe Asp His Phe Cys Ser Cys Tyr Gln Tyr Gln Asp Gly Cys  
820 825 830

Ile Val Trp His Gln Tyr Ile Asn Cys Phe Thr Leu Gln Asp Leu Leu  
835 840 845

Gln His Ser Glu Tyr Ile Thr His Glu Ile Thr Val Leu Ile Ile Tyr  
850 855 860

Asn Leu Leu Thr Ile Val Glu Met Leu His Lys Ala Glu Ile Val His  
865 870 875 880

Gly Asp Leu Ser Pro Arg Cys Leu Ile Leu Arg Asn Arg Ile His Asp  
885 890 895

Pro Tyr Asp Cys Asn Lys Asn Asn Gln Ala Leu Lys Ile Val Asp Phe  
900 905 910

Ser Tyr Ser Val Asp Leu Arg Val Gln Leu Asp Val Phe Thr Leu Ser  
915 920 925

Gly Phe Arg Thr Val Gln Ile Leu Glu Gly Gln Lys Ile Leu Ala Asn

ES 2 620 582 T3

930		935		940											
Cys	Ser	Ser	Pro	Tyr	Gln	Val	Asp	Leu	Phe	Gly	Ile	Ala	Asp	Leu	Ala
945					950					955					960
His	Leu	Leu	Leu	Phe	Lys	Glu	His	Leu	Gln	Val	Phe	Trp	Asp	Gly	Ser
				965					970					975	
Phe	Trp	Lys	Leu	Ser	Gln	Asn	Ile	Ser	Glu	Leu	Lys	Asp	Gly	Glu	Leu
			980					985					990		
Trp	Asn	Lys	Phe	Phe	Val	Arg	Ile	Leu	Asn	Ala	Asn	Asp	Glu	Ala	Thr
		995					1000						1005		
Val	Ser	Val	Leu	Gly	Glu	Leu	Ala	Ala	Glu	Met	Asn	Gly	Val	Phe	
	1010					1015					1020				
Asp	Thr	Thr	Phe	Gln	Ser	His	Leu	Asn	Lys	Ala	Leu	Trp	Lys	Val	
	1025					1030					1035				
Gly	Lys	Leu	Thr	Ser	Pro	Gly	Ala	Leu	Leu	Phe	Gln				
	1040					1045					1050				

<210> 2

<211> 3749

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 620 582 T3

<400> 2  
 aggggcgtgg ccacgtcgac cgcgcgggac cgtaaattt gaaacttggc ggctaggggt 60  
 gtgggcttga ggtggccggt ttgttaggga gtcgtgtacg tgccttggtc gcttctgtag 120  
 ctccgagggc aggttgcgga agaaagccca ggcggtctgt ggcccagagg aaaggcctgc 180  
 agcaggacga ggacctgagc caggaatgca ggatggcggc ggtgaagaag gaagggggtg 240  
 ctctgagtga agccatgtcc ctggagggag atgaatggga actgagtaa gaaaatgtac 300  
 aacctttaag gcaagggcgg atcatgtcca cgcttcaggg agcactggca caagaatctg 360  
 cctgtaacaa tactcttcag cagcagaaac gggcatttga atatgaaatt cgattttaca 420  
 ctggaaatga ccctctggat gtttgggata ggtatatcag ctggacagag cagaactatc 480  
 ctcaaggtgg gaaggagagt aatatgtcaa cgttattaga aagagctgta gaagcactac 540  
 aaggagaaaa acgatattat agtgatectc gatttctcaa tctctggctt aaattagggc 600  
 gtttatgcaa tgagcctttg gatatgtaca gttacttgca caaccaaggg attggtgttt 660  
 cacttgctca gttctatatc tcatgggcag aagaatatga agctagagaa aactttagga 720  
 aagcagatgc gatatttcag gaagggattc aacagaaggc tgaaccacta gaaagactac 780

ES 2 620 582 T3

agtcccagca ccgacaattc caagctcgag tgtctcggca aactctgttg gcacttgaga 840  
 aagaagaaga ggaggaagtt tttgagtctt ctgtaccaca acgaagcaca ctagctgaac 900  
 taaagagcaa agggaaaaag acagcaagag ctccaatcat cCGtGtagga ggtgctctca 960  
 aggctccaag ccagaacaga ggactccaaa atccatttcc tcaacagatg caaaataata 1020  
 gtagaattac tgtttttgat gaaaatgctg atgaggcttc tacagcagag ttgtctaagc 1080  
 ctacagtcca gccatggata gcacccccca tgcccagggc caaagagaat gagctgcaag 1140  
 caggcccttg gaacacaggc aggtccttgg aacacaggcc tCGtgGcaat acagcttcac 1200  
 tgatagctgt acccgctgtg cttcccagtt tcaactccata tGtggaagag actgcacaac 1260  
 agccagttat gacacatgt aaaattgaac ctagtataaa ccacatccta agcaccagaa 1320  
 agcctggaaa ggaagaagga gatcctctac aaagggttca gagccatcag caagcgtctg 1380  
 aggagaagaa agagaagatg atgtattgta aggagaagat ttatgcagga gtaggggaat 1440  
 tctcctttga agaaattcgg gctgaagttt tccggaagaa attaaaagag caaaggaag 1500  
 ccgagctatt gaccagtGca gagaagagag cagaaatgca gaaacagatt gaagagatgg 1560  
 agaagaagct aaaagaaatc caaactactc agcaagaaag aacaggtgat cagcaagaag 1620  
 agacgatgcc tacaaggag acaactaaac tgcaaattgc ttccgagtct cagaaaatac 1680  
 caggaatgac tctatccagt tctgtttgtc aagtaaactg ttgtgccaga gaaacttcac 1740  
 ttgcggagaa catttgGcag gaacaacctc attctaaagg tcccagtGta cttttctcca 1800  
 tttttgatga gtttcttctt tcagaaaaga agaataaaag tcctcctgca gatccccac 1860  
 gagttttagc tcaacgaaga ccccttgCag ttctcaaaac ctCagaaagc atcacctcaa 1920  
 atgaagatgt gtctccagat gtttGtgatg aatttacagg aattgaacct ttgagcgagg 1980  
 atgccattat cacaggcttc agaaatgtaa caatttGtcc taaccCagaa gacacttGtg 2040  
 actttgCag agcagctcgt tttgtatcca ctCcttttca tgagataatg tccttgaagg 2100  
 atctcccttc tgatcctgag agactgttac cGgaagaaga tctagatgta aagacctctg 2160  
 aggaccagca gacagcttgt ggcactatct acagtCagac tctcagcatc aagaagctga 2220  
 gcccaattat tgaagacagt cgtgaagcca cacactctc tggcttctct ggttcttctg 2280  
 cctcggttgc aagcacctcc tccatcaaat gtcttcaaat tcctgagaaa ctagaactta 2340  
 ctaatgagac ttcagaaaac cctactcagt caccatggtg ttcacagtat cgCagacagc 2400  
 tactgaagtc cctaccagag ttaagtgcct ctgCagagtt gtgtatagaa gacagaccaa 2460  
 tgcctaagtt ggaaattgag aaggaaattg aattaggtaa tgaggattac tgcattaaac 2520  
 gagaatacct aatatgtgaa gattacaagt tattctgggt ggcGcaaga aactctgCag 2580  
 aattaacagt aataaaggta tcttctcaac ctgtccatg ggacttttat atcaacctca 2640  
 agttaaagga acgtttaaat gaagattttg atcatttttg cagctgttat caatatcaag 2700

atggctgtat tgtttggcac caatatataa actgcttcac ccttcaggat cttctccaac 2760  
 acagtgaata tattacccat gaaataacag tgttgattat ttataacctt ttgacaatag 2820  
 tggagatgct acacaaagca gaaatagtcc atggtgactt gagtccaagg tgtctgattc 2880  
 tcagaaacag aatccaogat ccctatgatt gtaacaagaa caatcaagct ttgaagatag 2940  
 tggacttttc ctacagtgtt gaccttaggg tgcagctgga tgtttttacc ctcagcggct 3000  
 ttcggactgt acagatcctg gaaggacaaa agatcctggc taactgttct tctccctacc 3060  
 aggtagacct gtttggata gcagatttag cacatttact attgttcaag gaacacctac 3120  
 aggtcttctg ggatgggtcc ttctggaaac ttagcctaaa tatttctgag ctaaaagatg 3180  
 gtgaattgtg gaataaattc tttgtgcgga ttctgaatgc caatgatgag gccacagtgt 3240  
 ctgttcttgg ggagcttgca gcagaaatga atgggggttt tgacactaca ttccaaagtc 3300  
 acctgaacaa agccttatgg aaggtaggga agttaactag tcctggggct ttgctctttc 3360  
 agtgagctag gcaatcaagt ctcacagatt gctgcctcag agcaatggtt gtattgtgga 3420  
 aactgaaac tgtatgtgct gtaatttaat ttaggacaca tttagatgca ctaccattgc 3480  
 tgttctactt tttggtacag gtatattttg acgtcactga tttttttat acagtgatat 3540  
 acttactcat ggccttgtct aacttttgtg aagaactatt ttattctaaa cagactcatt 3600  
 acaaatgggtt accttggtat ttaaccatt tgtctctact tttccctgta cttttcccat 3660  
 ttgtaatttg taaaatgttc tcttatgatc accatgtatt ttgtaaataa taaaatagta 3720  
 tctgttaaat ttgtgcttct aaaaaaaaa 3749

<210> 3

5 <211> 19

<212> ARN

<213> construcción artificial

<220>

10 <223> construcción sintética

<400> 3

gauggugaau uguggaaua

19

<210> 4

<211> 19

<212> ARN

<213> construcción artificial

<220>

5 <223> construcción sintética

<400> 4

**gaaacgggca uuugaaau**

19

<210> 5

10 <211> 19

<212> ARN

<213> construcción artificial

<220>

15 <223> construcción sintética

<400> 5

**gcaaugagcc uuuggauau**

19

<210> 6

<211> 19

20 <212> ARN

<213> construcción artificial

<220>

<223> construcción sintética

25

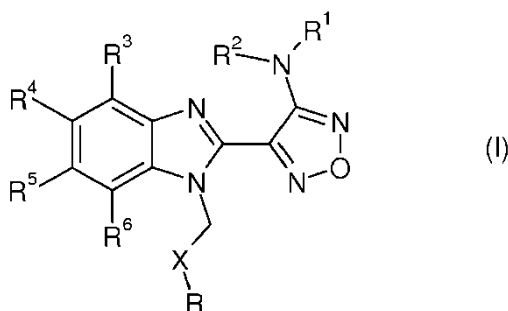
<400> 6

**caauacagcu ucacugaua**

19

## REIVINDICACIONES

1. Uso ex vivo de BUBR1 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, 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 metilendioxo; 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 hidroxio o alcoxi 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 alcoxi 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, 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 metilendioxo;

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 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 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,

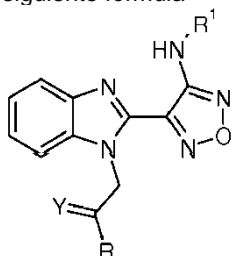


y en donde el prefijo inferior designa un radical que tiene hasta e incluye un máximo de 7, especialmente hasta e incluye un máximo de 4 átomos de carbono,

y en el que la respuesta es de una enfermedad en un sujeto, y el biomarcador BUBR1 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,  
 y en donde el prefijo inferior designa un radical que tiene hasta e incluye un máximo de 7, especialmente hasta e  
 15 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



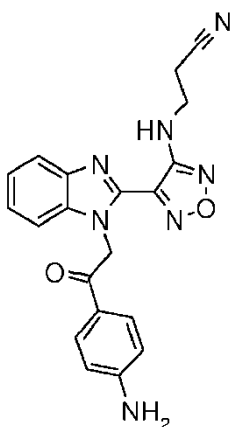
en donde R, Y y R<sup>1</sup> se definen como sigue:

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.

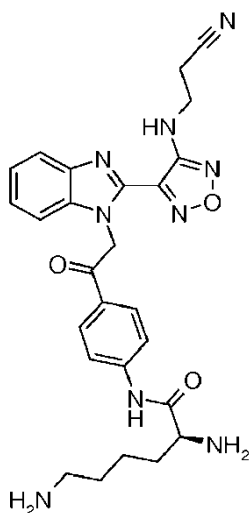
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto es



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 es un pro-fármaco farmacéuticamente aceptable, que 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 hidrocioruro del mismo, lo más preferiblemente una sal dihidrocioruro 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 ovario, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de pulmón y cáncer cervical.
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 de pulmón y cáncer gástrico.
- 10 13. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde una concentración elevada de BUBR1 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 bajas de BUBR1 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) tomadas después del inicio del tratamiento y en comparación con una muestra o muestras tomadas del mismo sujeto antes de iniciar el tratamiento; o
- iii) 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.
- 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.
- 25 16. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la muestra se deriva de tejido tumoral, tejido normal, líneas celulares o células tumorales circulantes, preferiblemente en donde se deriva de tejido tumoral.
17. 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 BUBR1 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 menor de BUBR1 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 18. 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 BUBR1, medida ex vivo en una muestra de un sujeto humano que no es menor que un valor estándar o conjunto de valores estándares, en donde una concentración menor de BUBR1 en la muestra obtenida

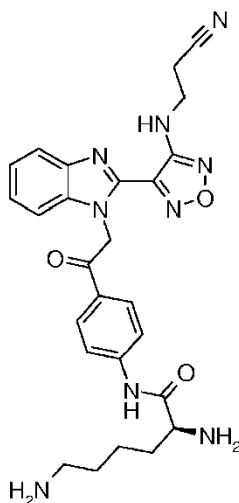
del sujeto con relación al valor estándar o conjunto de valores estándares es predictiva de resistencia al compuesto de fórmula (I).

5 19. El compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la enfermedad neoplásica es un cáncer, preferiblemente un cáncer tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10, 11 ó 12.

10 20. 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 BUBR1 en una muestra tomada de un sujeto con un cáncer, que 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 estándares de una concentración de BUBR1 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 BUBR1, en donde una concentración menor de BUBR1 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 21. El kit de acuerdo con la reivindicación 20, en donde los reactivos comprenden un reactivo de captura que comprende un detector para BUBR1 y un reactivo detector, preferiblemente, en donde el reactivo de captura es un anticuerpo.

20 22. El kit de acuerdo con la reivindicación 20 o la reivindicación 21, en donde el compuesto es un compuesto de la siguiente fórmula



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

Figura 1

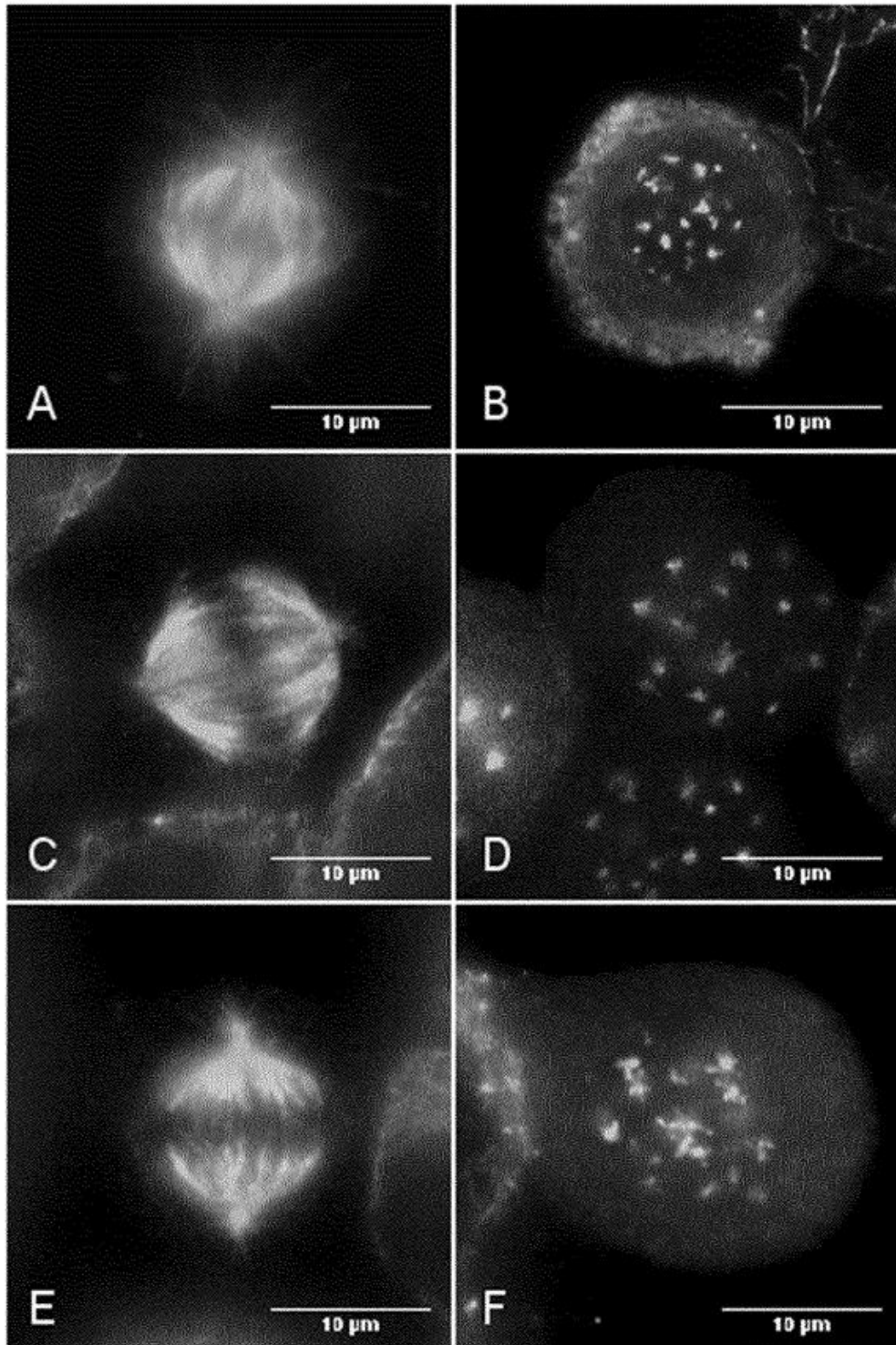


Figura 2

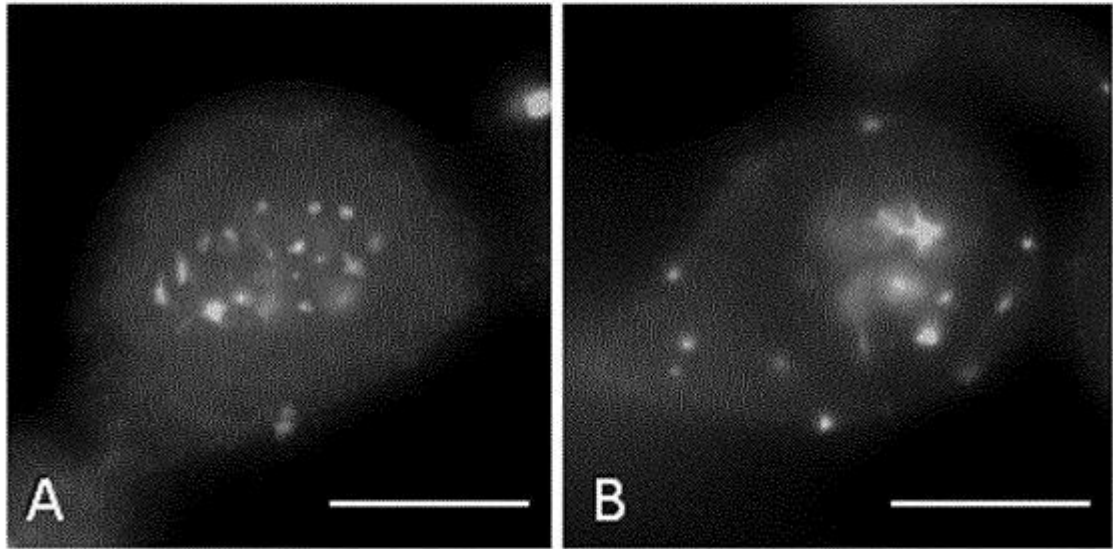


Figura 3

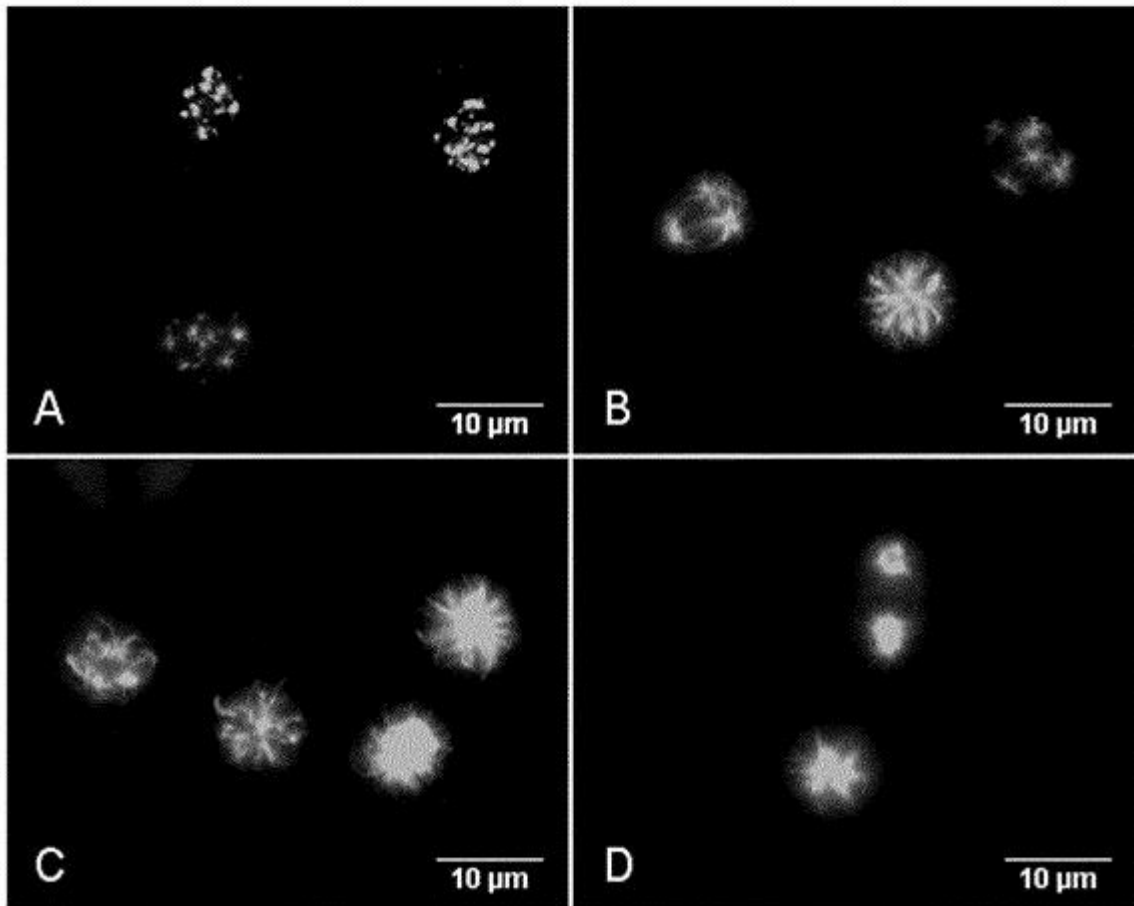




Figura 4

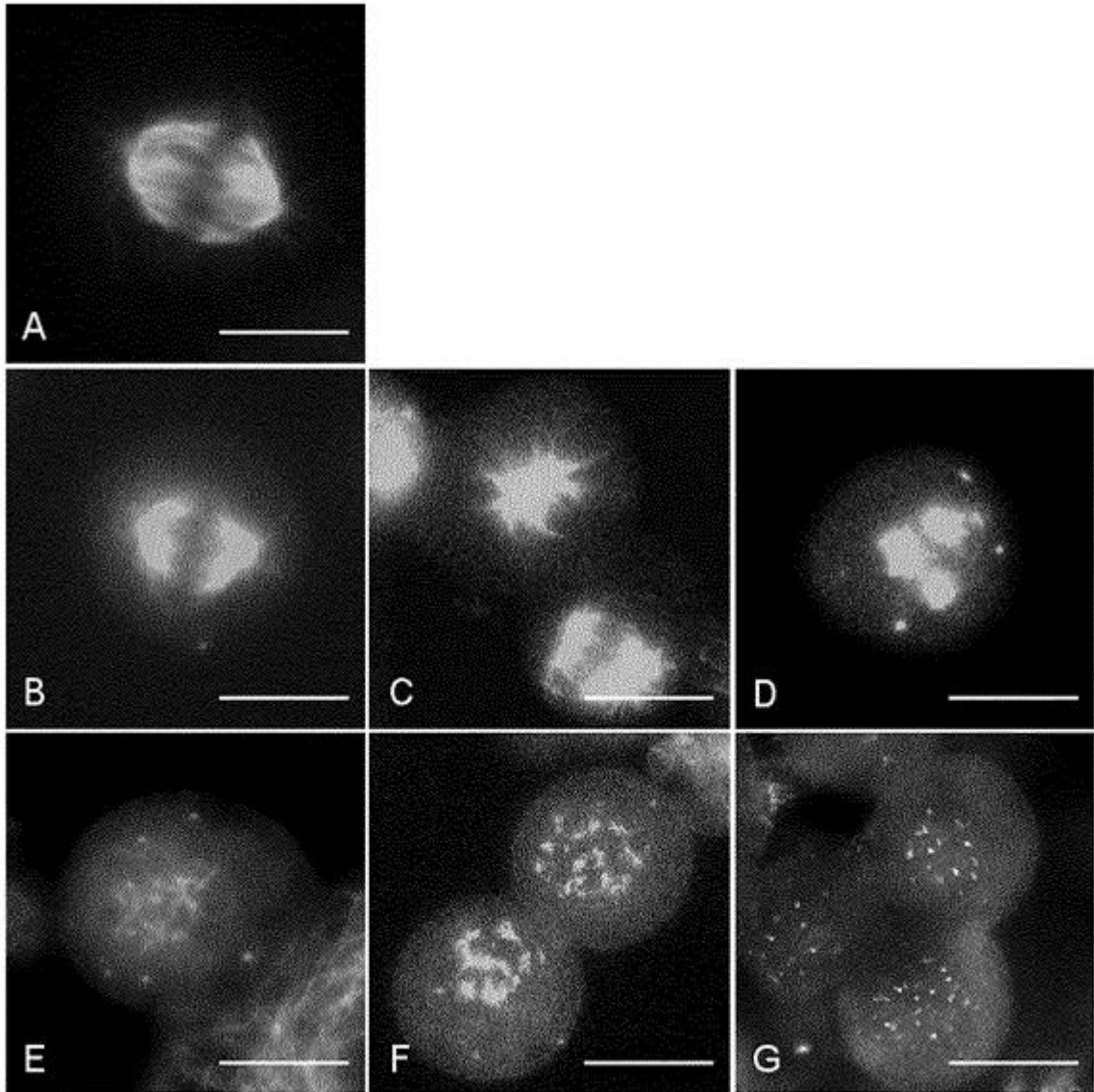




Figura 5

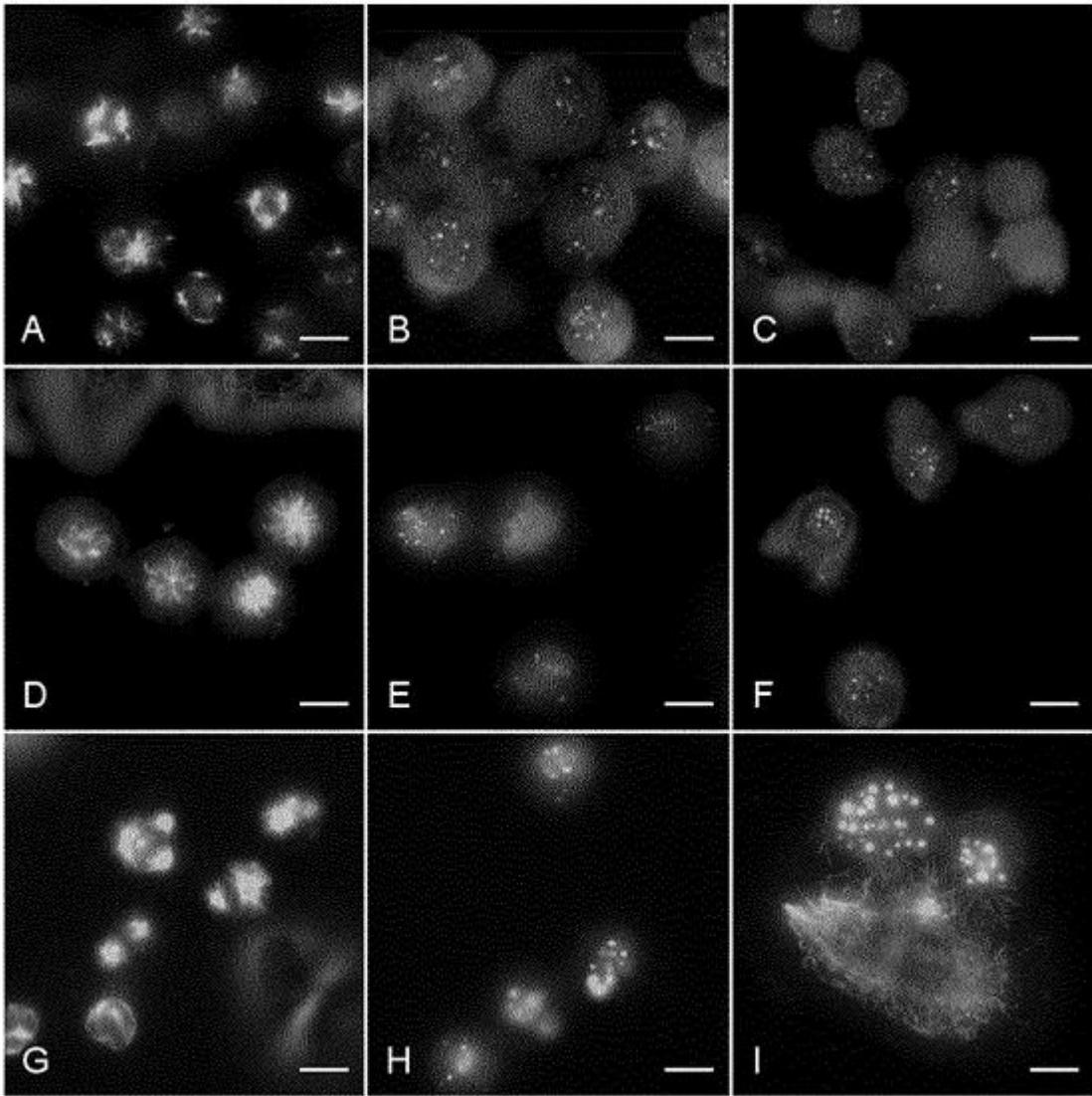


Figura 6

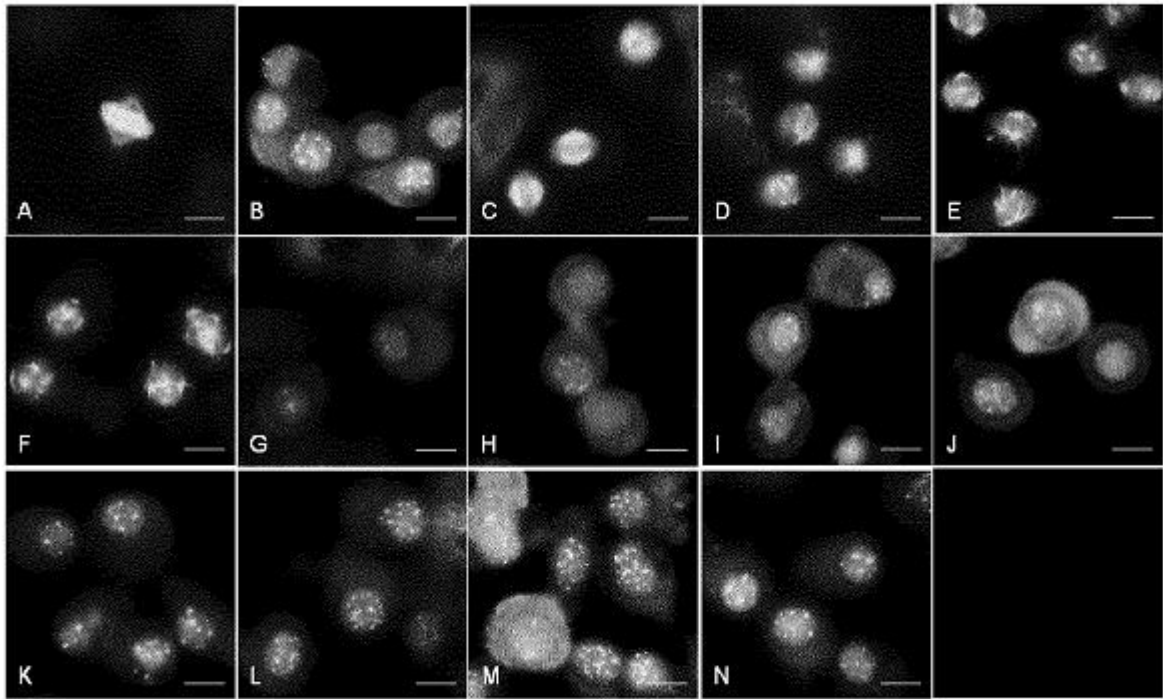
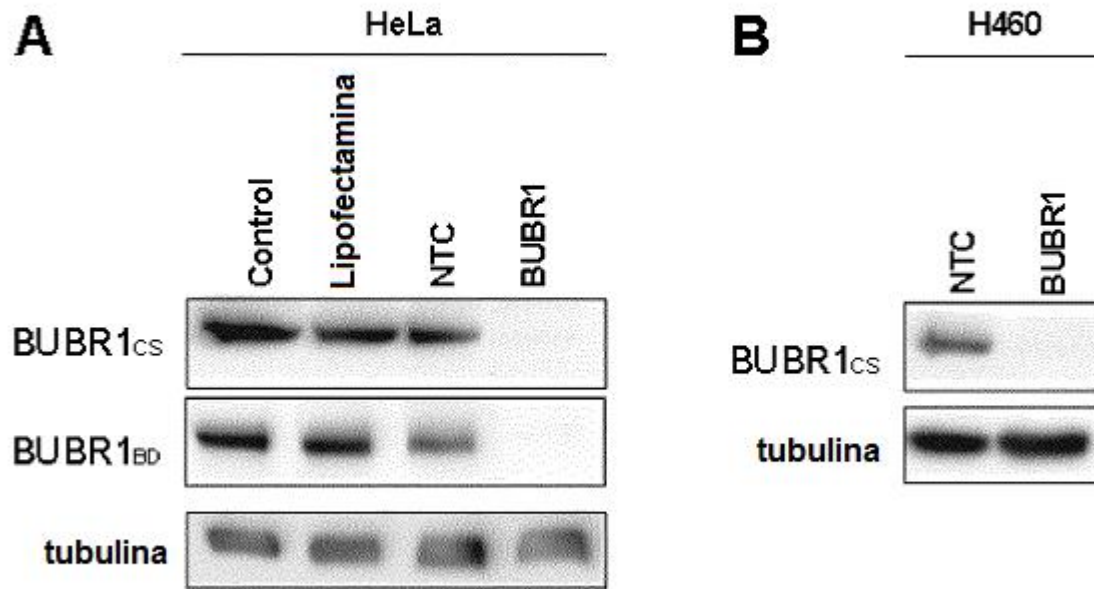


Figura 7



**Figura 8**

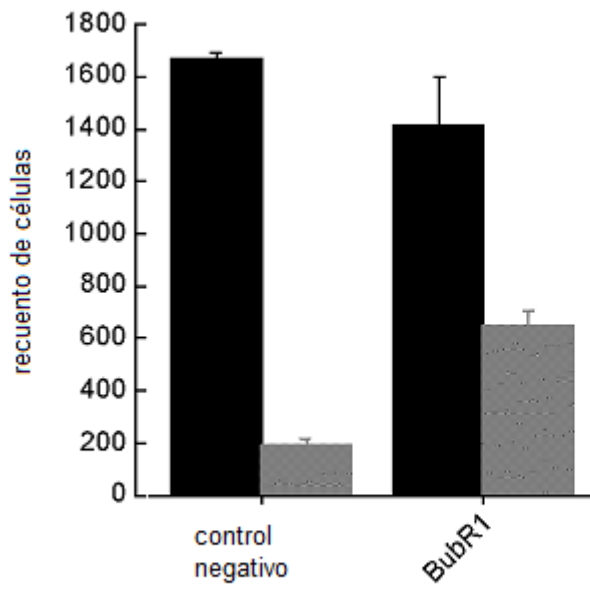
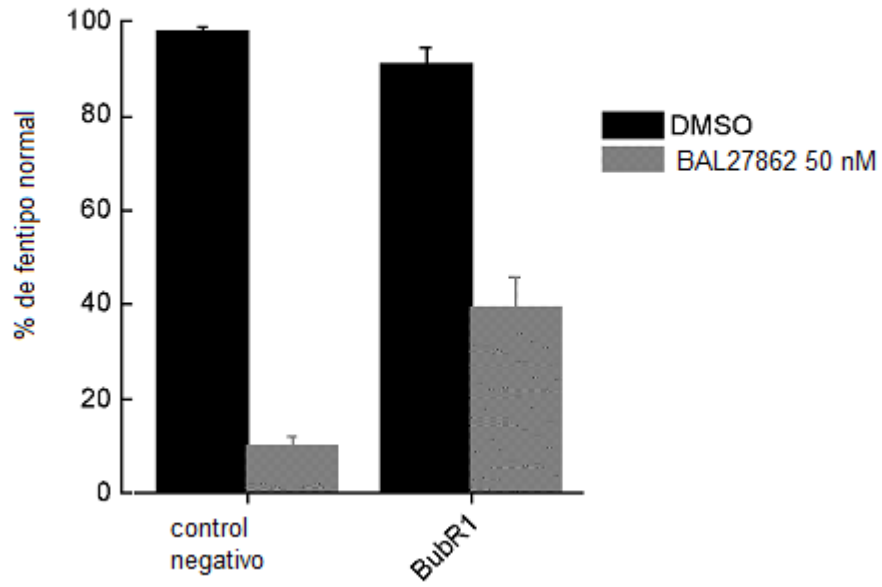
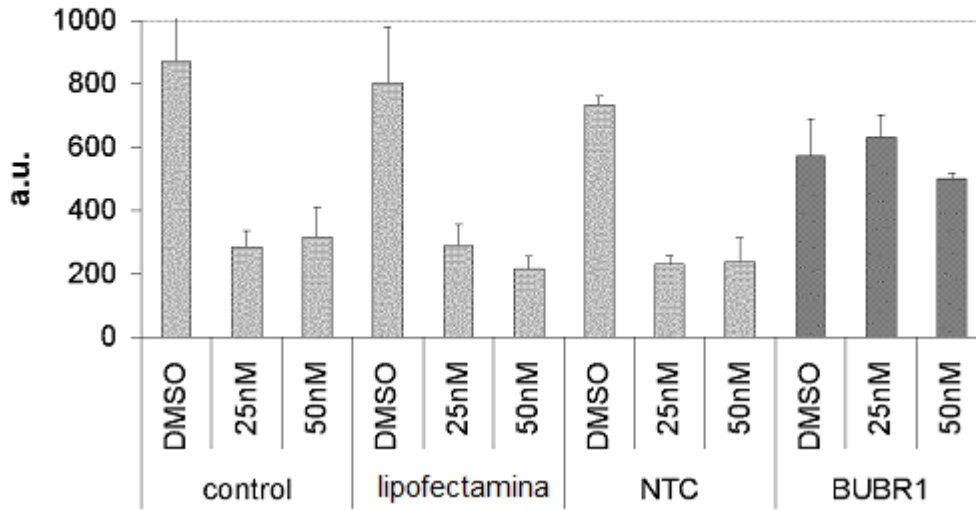


Figura 9:

**A**



**B**

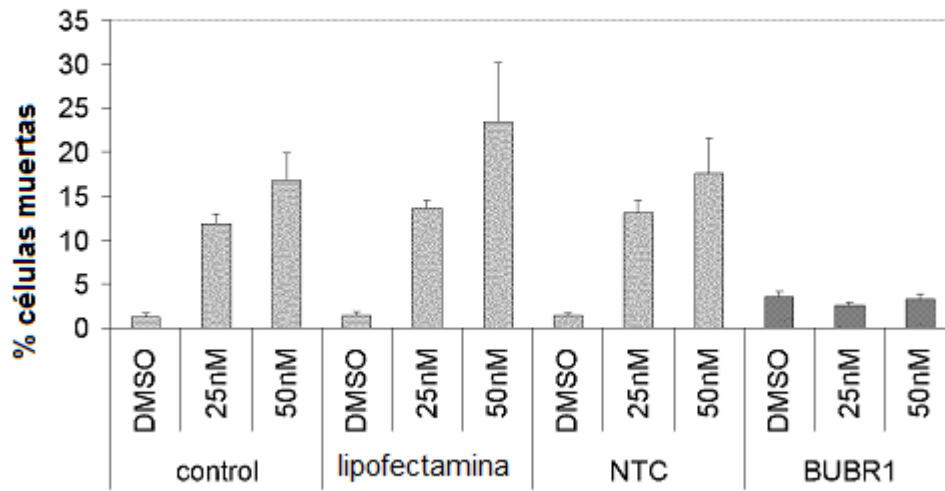
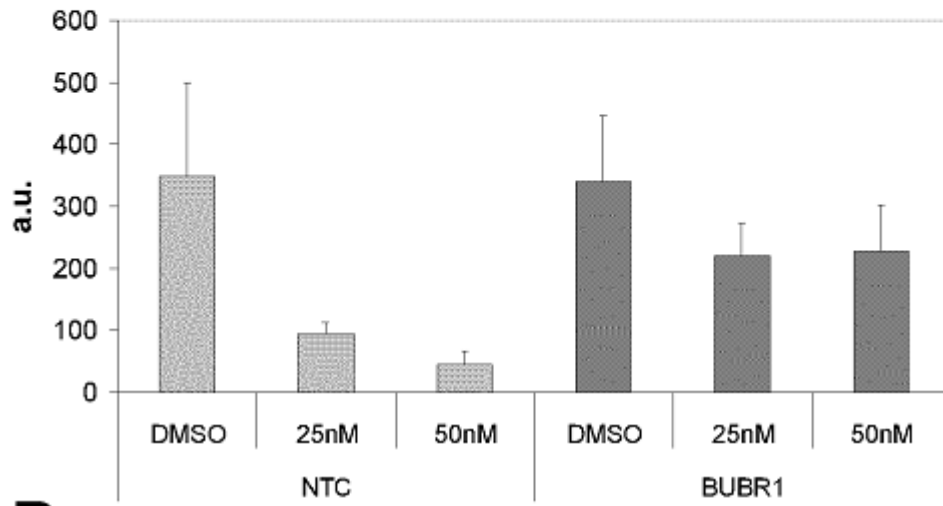


Figura 10:

**A**



**B**

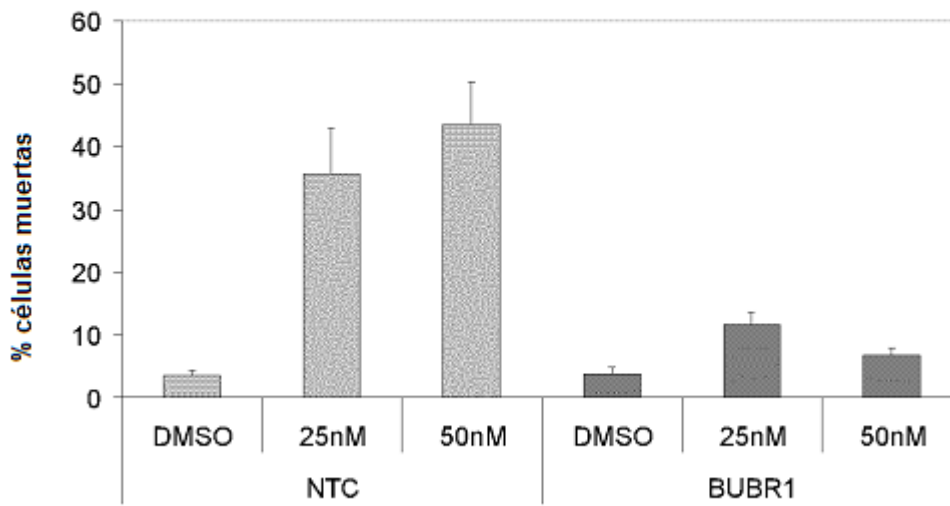
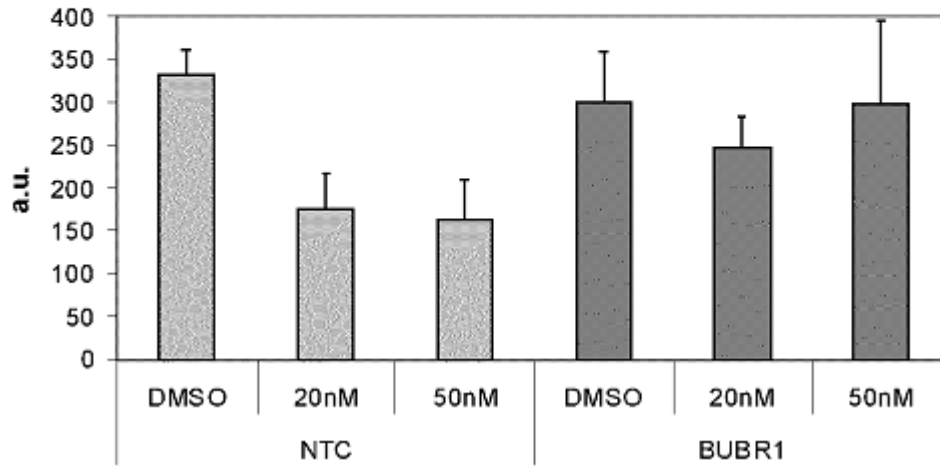


Figura 11:

**A**



**B**

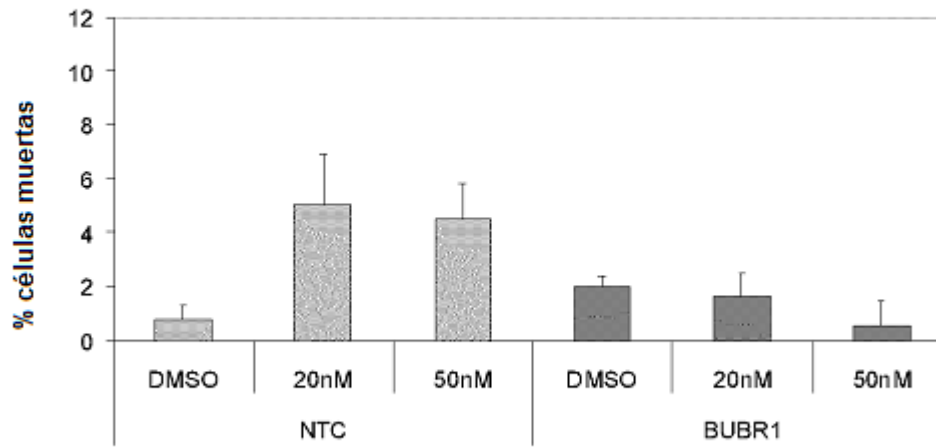


Figura 12:

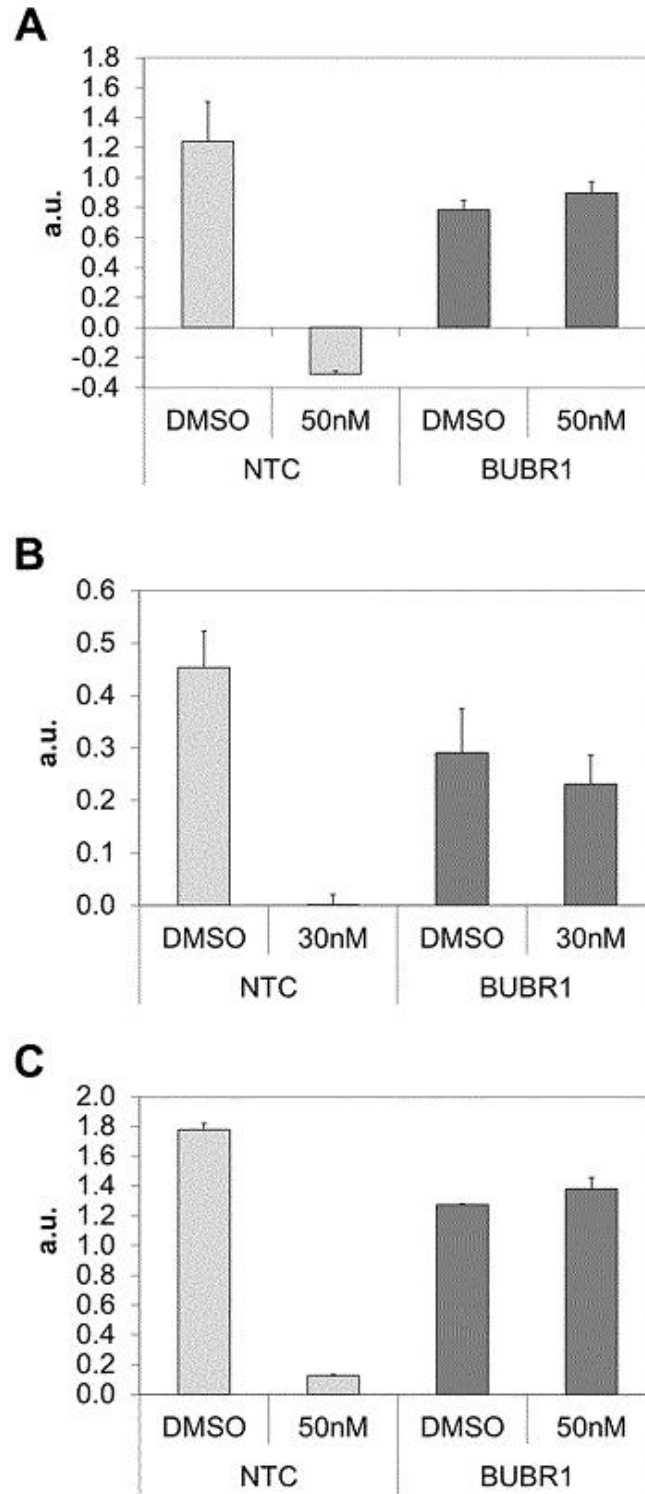




Figura 13:

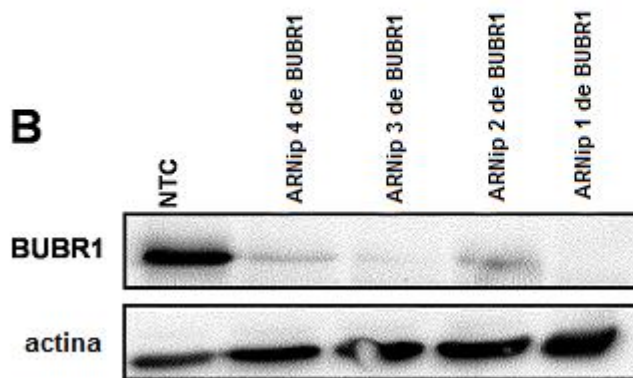
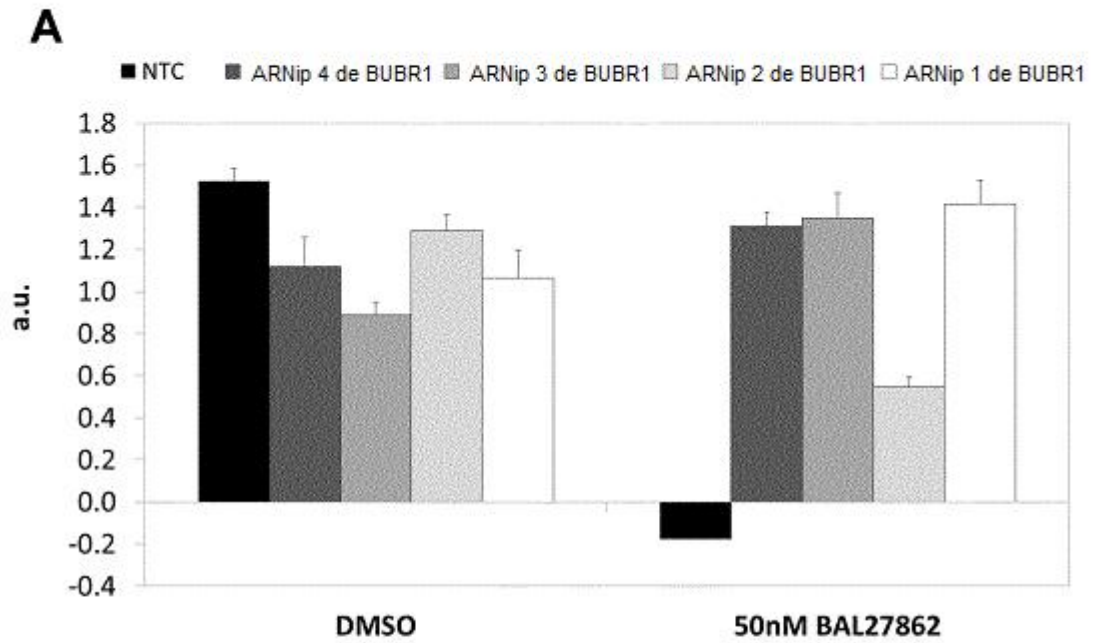


Figura 14:

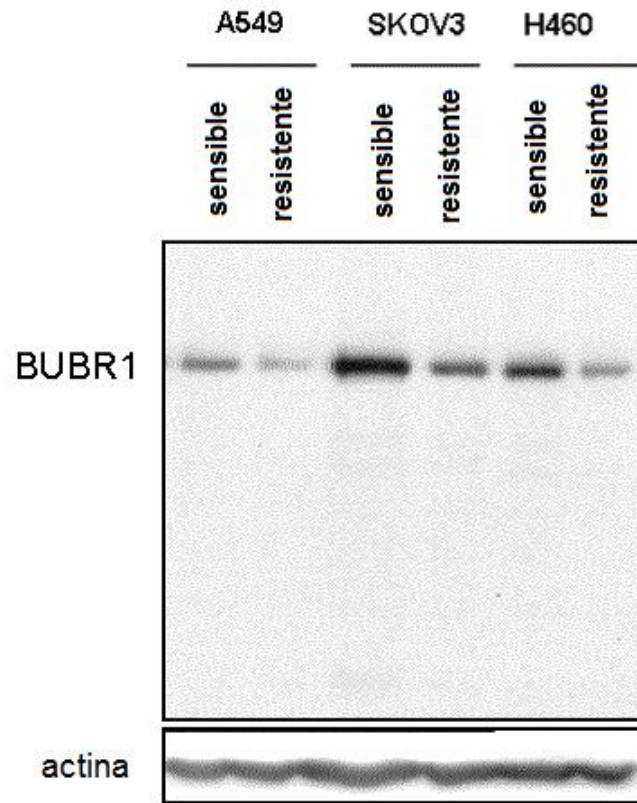


Figura 15:

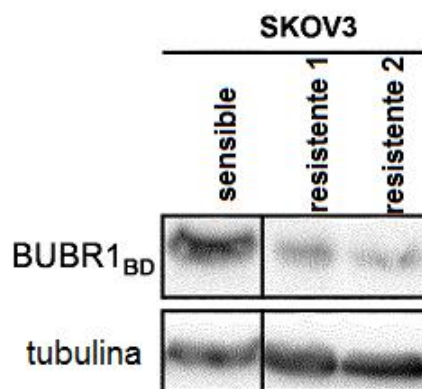


Figura 16

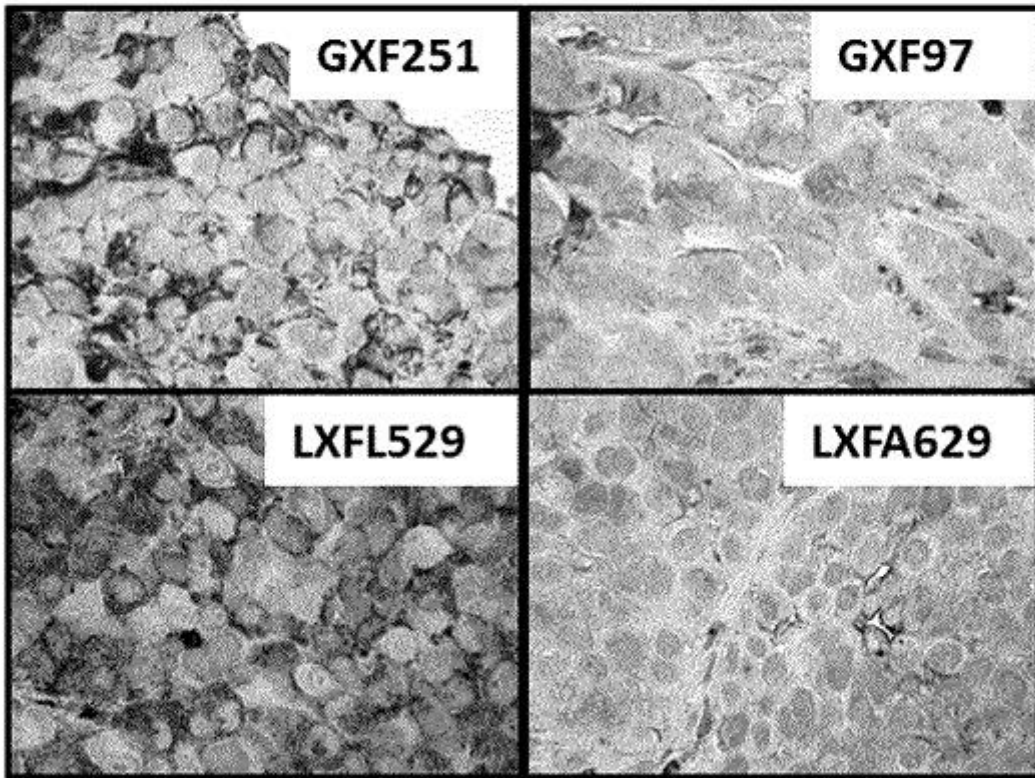
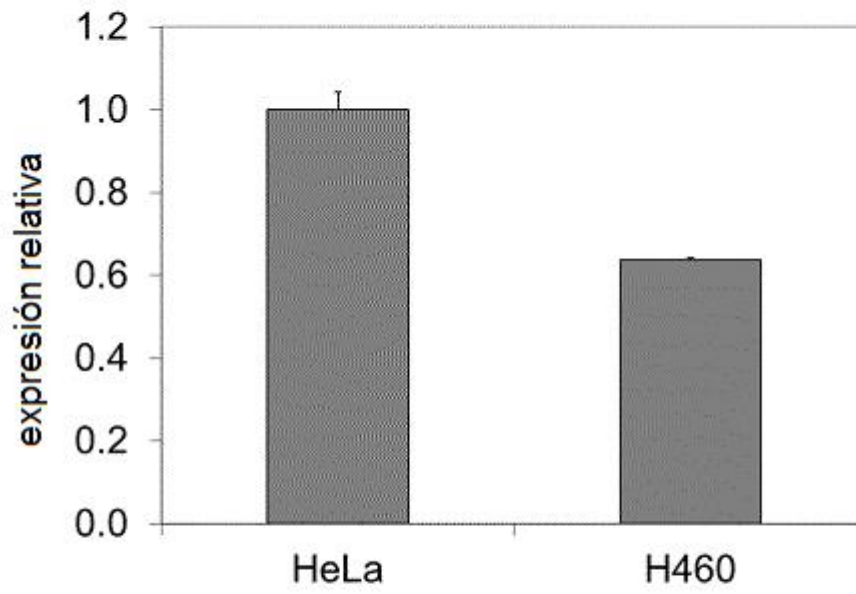
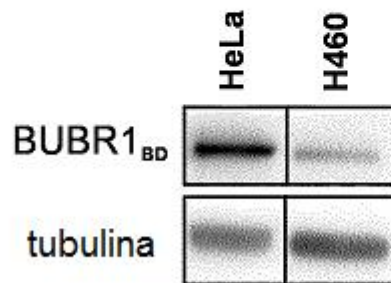


Figura 17

**A**



**B**



**Figura 18**

## Secuencia de proteínas BUBR1 [Homo sapiens] (SEQ. ID. NO: 1)

```

1 maavkkegga lseamslegd ewelskenvq plrqgrimst lqgalagesa cnntlqgqkr
61 afeyeirfyt gndpldvwdr yiswteqnyq qggkesnmst lleravealq gekryysdpr
121 flnlwlklgr lcnepldmys ylhnggigvs laqfyiswae eyearenfrk adaifqegig
181 qkaeplerlq sqhrqfgarv srqtlalek eeeevfess vpqrstlael kskgkktara
241 piirvggalk apsqnrqlq pfpqgmqnns ritvfdenad eastaelskp tvqpwappm
301 prakenelqa gpwntgrsle hrprgntasl iavpavlpsf tpyveetaqq pvmtpckiep
361 sinhilstrk pgkeegdplq rvqshqqase ekkekmyck ekiyagvgef sfeeiraevf
421 rkkлкеgrea elltsaekra emqkqieeme kklkeiqttq qertgdqgee tmptkettkl
481 qiasesskip gmtlsssvcq vnccaretsl aeniwqeqph skgpsvpfsi fdefllsekk
541 nkspadppr vlagrrplav lktsesitsn edvspdvode ftgieplsed aaitgfrnvt
601 icnpedctd faraarfvst pfheimsikd lpsdperllp eedldvktse dqqtacgtiy
661 sqtlsikkls piiedsreat hssgfgsgsa svastssikc lqipeklelt netsenptqs
721 pwcsqyrrql lkslpelsas aelciedrpm pkleiekieie lgnedycikr eylicedykl
781 fwvaprnasae ltvikvssqp vpwdfyinlk lkerlnedfd hfcscyqyqd gcivwhqyin
841 cftlqdllqh seyitheitv liiynlltiv emlhkaeivh gdlsprclil rnrihdpydc
901 nknnqalkiv dfsysvdlrv qldvftlsgf rtvgilegqk ilancsspyq vdlfgiadla
961 hlllfkehlq vfdgswfwkl sqniselkdg elwnkffvri lnandeatvs vlgelaaemn
1021 gvfdttfqsh lnkalwkvqk ltspgallfq

```



**Figura 19**

## Secuencia de ácido nucleico [Homo sapiens] (SEQ. ID. NO. 2)

```

1 aggggctggtg ccacgtcgac cgcgcgggac cgttaaattt gaaacttggc ggctaggggt
61 gtgggcttga ggtggccggt ttgttaggga gtctgttacg tgccttggtc gcttctgtag
121 ctccgagggc aggttgcgga agaaagccca ggccgtctgt ggcccagagg aaaggcctgc
181 agcaggacga ggacctgagc caggaatgca ggatggcggc ggtgaagaag gaagggggtg
241 ctctgagtga agccatgtcc ctggagggag atgaatggga actgagtaaa gaaaatgtac
301 aacctttaag gcaagggcgg atcatgtcca cgcttcaggg agcactggca caagaatctg
361 cctgtaacaa tactcttcag cagcagaaac gggcatttga atatgaaatt cgattttaca
421 ctggaaatga ccctctggat gtttgggata ggtatatcag ctggacagag cagaactatc
481 ctcaaggttg gaaggagagt aatatgtcaa cgttattaga aagagctgta gaagcactac
541 aaggagaaaa acgatattat agtgatcctc gatttctcaa tctctggctt aaattagggc
601 gtttatgcaa tgagcctttg gatatgtaca gttacttgca caaccaaggg attggtgttt
661 cacttgctca gttctatata tcatgggcag aagaatatga agctagagaa aactttagga
721 aagcagatgc gatatttcag gaagggattc aacagaaggc tgaaccacta gaaagactac
781 agtcccagca ccgacaattc caagctcgag tgtctcggca aactctgttg gcacttgaga
841 aagaagaaga ggaggaagtt tttgagtctt ctgtaccaca acgaagcaca ctagctgaac
901 taaagagcaa agggaaaaag acagcaagag ctccaatcat ccgtgtagga ggtgctctca
961 aggctccaag ccagaacaga ggactccaaa atocatttcc tcaacagatg caaaataata
1021 gtagaattac tgtttttgat gaaaatgctg atgaggcttc tacagcagag ttgtctaagc
1081 ctacagtcca gccatggata gcacccccca tgcccagggc caaagagaaat gagctgcaag
1141 caggoccttg gaacacaggc aggtccttgg aacacaggcc togtggcaat acagcttcac
1201 tgatagctgt acccgctgtg cttcccagtt tcaactccata tgtggaagag actgcacaac
1261 agccagttat gacaccatgt aaaattgaac ctagtataaa ccacatccta agcaccagaa
1321 agcctgaaaa ggaagaagga gatcctctac aaagggttca gagccatcag caagcgtctg
1381 aggagaagaa agagaagatg atgtattgta aggagaagat ttatgcagga gtaggggaat
1441 tctcctttga agaaattcgg gctgaagttt tccggaagaa attaaaagag caaaggggaag
1501 ccgagctatt gaccagtgca gagaagagag cagaaatgca gaaacagatt gaagagatgg
1561 agaagaagct aaaagaaatc caaactactc agcaagaaag aacaggtgat cagcaagaag
1621 agacgatgcc tacaaggag acaactaaac tgcaaattgc ttccgagtct cagaaaatac
1681 caggaatgac tctatccagt tctgtttgtc aagtaaactg ttgtgccaga gaaacttcac
1741 ttgoggagaa catttggcag gaacaacctc attctaaagg tcccagtgtc cctttctcca
1801 tttttgatga gtttcttctt tcagaaaaga agaataaaaag tctcctgca gatccccac
1861 gagttttagc tcaacgaaga ccccttgtag ttctcaaac ctcagaaagc atcacctcaa
1921 atgaagatgt gtctccagat gtttgtgatg aatttacagg aattgaacct ttgagcgagg
1981 atgccattat cacaggcttc agaaatgtaa caatttgtcc taaccagaa gacacttgtg
2041 actttgccag agcagctcgt tttgtatcca ctcttttca tgagataatg tcttgaagg
2101 atctoccttc tgatcctgag agactgttac cggaagaaga tctagatgta aagacctctg
2161 aggaccagca gacagcttgt ggcaactatc acagtcagac tctcagcatc aagaagctga
2221 gcccaattat tgaagacagt cgtgaagcca cacactcctc tggcttctct ggttcttctg

```

## ES 2 620 582 T3

2281 cctcggttgc aagcacctcc tccatcaaat gtcttcaaat tcctgagaaa ctagaactta  
2341 ctaatgagac ttcagaaaac cctactcagt caccatgggtg ttcacagtat cgcagacagc  
2401 tactgaagtc cctaccagag ttaagtgcct ctgcagagtt gtgtatagaa gacagaccaa  
2461 tgcctaagtt ggaaattgag aaggaaattg aattaggtaa tgaggattac tgcattaaac  
2521 gagaatacct aatatgtgaa gattacaagt tattctgggtg ggcgccaaga aactctgcag  
2581 aattaacagt aataaaggta tcttctcaac ctgtcccatg ggacttttat atcaacctca  
2641 agttaaagga acgtttaaat gaagattttg atcatttttg cagctgttat caatatcaag  
2701 atggctgtat tgtttggcac caatatataa actgcttcac ccttcaggat cttctccaac  
2761 acagtgaata tattacccat gaaataacag tgttgattat ttataacctt ttgacaatag  
2821 tggagatgct acacaaagca gaaatagtcc atggtgactt gagtccaagg tgtctgattc  
2881 tcagaaacag aatccacgat ccctatgatt gtaacaagaa caatcaagct ttgaagatag  
2941 tggacttttc ctacagtgtt gaccttaggg tgcagctgga tgtttttacc ctcagcggct  
3001 ttcggactgt acagatcctg gaaggacaaa agatcctggc taactgttct tctccctacc  
3061 aggtagacct gtttgggtata gcagatttag cacatttact attgttcaag gaacacctac  
3121 aggtcttctg ggatgggtcc ttctggaaac ttagccaaaa ttttctgag ctaaaagatg  
3181 gtgaattgtg gaataaattc tttgtgcgga ttctgaatgc caatgatgag gccacagtgt  
3241 ctgttcttgg ggagcttgca gcagaaatga atggggtttt tgacactaca ttccaaagtc  
3301 acctgaacaa agccttatgg aaggtaggga agttaactag tcctggggct ttgctctttc  
3361 agtgagctag gcaatcaagt ctcacagatt gctgcctcag agcaatgggtt gtattgtgga  
3421 aactgaaac tgtatgtgct gtaatttaat ttaggacaca tttagatgca ctaccattgc  
3481 tgttctactt tttggtacag gtatattttg acgtcactga tttttttat acagtgatat  
3541 acttactcat ggccttgtct aacttttgtg aagaactatt ttattctaaa cagactcatt  
3601 acaaatgggtt accttgttat ttaaccatt tgtctctact tttccctgta cttttcccat  
3661 ttgtaatttg taaaatgttc tcttatgatc accatgtatt ttgtaaataa taaaatagta  
3721 tctgttaaat ttgtgcttct aaaaaaaaa