

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 413**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2012 PCT/EP2012/052954**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2012 WO12113802**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2012 E 12704826 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 2678679**

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

30 Prioridad:

24.02.2011 EP 11155774

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

04.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 621 413 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

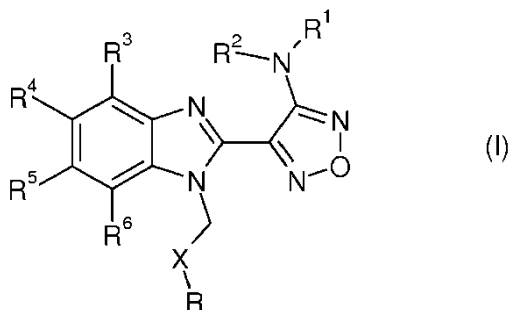
Uso de tubulina acetilada como un biomarcador de la respuesta de fármacos a furazanobencimidazoles

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

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

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

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



en donde

R representa fenilo, tienilo o piridinilo

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

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

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

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

o R⁴ y R⁵ juntos representan metilendioxi;

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos;

o en donde

R representa fenilo o piridinilo

5 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-carbonilo, 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;

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

X representa oxígeno;

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

15 o R⁴ y R⁵ juntos representan metilendioxi;

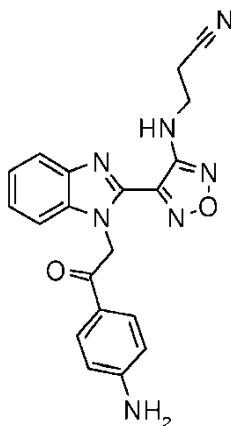
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos;

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.

20 Estos compuestos se describen en el documento WO2004/103994 A1. Estos compuestos han demostrado allí 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.

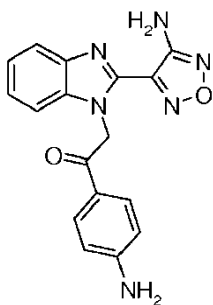
25 Un compuesto que cae dentro de esta clase, conocido como BAL27862, y mostrado en el documento WO2004/103994 A1 como ejemplo 58, tiene la estructura química y el nombre dado a continuación:



Nombre químico:

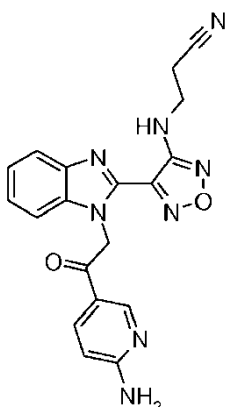
3-(4-{1-[2-(4-amino-fenil)-2-oxo-etil]-1H-benzimidazol-2-yl]-furazan-3-ilamino)-propionitrilo; o en esta memoria como Compuesto A

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



Nombre químico: 2-[2-(4-amino-furazan-3-il)-benzoimidazol-1-il]-1-(4-amino-fenil)-etanona; o en esta memoria como Compuesto B

y



5

Nombre químico: 3-(4-{1-[2-(6-amino-piridin-3-il)-2-oxo-etil]-1H-benzoimidazol-2-il}-furazan-3-ilamino)-propionitrilo; o en esta memoria como Compuesto C.

BAL27862 tiene actividad a lo largo de un amplio panel de modelos experimentales de xenoinjertos de tumores sólidos. Además de ello, la actividad se mantiene incluso en contra de modelos de tumores que han sido seleccionados en cuanto a la resistencia a agentes que fijan como objetivo microtúbulos convencionales (incluyendo los desestabilizadores de microtúbulos de alcaloides de la vinca y los estabilizadores de microtúbulos paclitaxel y epotilona B). La actividad de BAL27862 no se ve afectada por la sobre expresión de la bomba de P-gp en ningún modelo 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 considerados óptima en términos de efecto antiproliferativo indican una diferencia en el modo de acción a nivel molecular.

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

El poster "Los niveles de tubulina acetilada (AT) predicen la respuesta a la quimioterapia de TPF en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC) avanzado a nivel local", presentado en la 101ª Reunión Anual de la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer, describe que la tubulina acetilada podría predecir la respuesta al tratamiento combinado de docetaxel + lonafarnib o para el tratamiento combinado de TPF (docetaxel + cisplatino y 5-fluorouracilo).

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.

La investigación realizada en *Veterinary Science* 79(2), págs. 89-91 (2005) estudia la presencia de tubulina acetilada en el timo del cerdo mediante localización inmunohistológica. 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 la tubulina acetilada se puede utilizar como un biomarcador de la respuesta al tratamiento con un compuesto de fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se define más adelante.

En una realización preferida de la invención, concentraciones relativamente altas de tubulina acetilada en una muestra de tumor se asocian con una resistencia a BAL27862 tal como se describe más adelante.

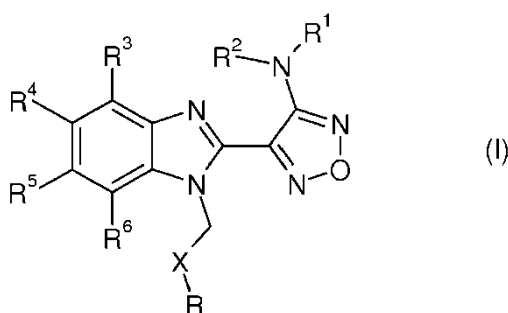
La tubulina se somete a una diversidad de modificaciones post-traduccionales, incluyendo destirosinación/tirosinación, acetilación, glutamitación, poliglicilación, fosforilación de residuos serina y fosforilación de residuos tirosina, haciéndola una de las proteínas más modificadas conocidas.

Existe constancia de que se produce la acetilación y desacetilación de las lisinas en la tubulina, aunque todavía no se ha elucidado la función exacta de estos cambios. El sitio mejor caracterizado de acetilación se encuentra en la lisina 40 de la tubulina alfa, a pesar de ello se han identificado sitios de acetilación adicionales tanto en la tubulina alfa como la beta. Hasta la fecha, se han identificado dos desacetilasas de microtúbulos: la histona desacetilasa 6 (HDAC6) y la Sirtuína T2 (SirT2). Muy recientemente, la alfaTAT1 y la subunidad Elp3 del complejo Elongador se han identificado como acetiltransferasas de la tubulina en la lisina 40. Además, se ha descrito que la proteína conocida como San presenta actividad acetiltransferasa de la tubulina beta en la lisina 252 (una acetilación novedosa de la tubulina beta descrita por San modula la polimerización de los microtúbulos mediante la reducción de la incorporación de la tubulina, Chih-Wen Chu et al., *Mol Biol Cell*. 2010, 22 de diciembre).

La tubulina acetilada también se conoce como microtúbulo(s) acetilado(s) o acetiltubulina y la expresión "tubulina acetilada" se empleará en la presente de modo que englobe también estos sinónimos. La designación tubulina acetilada comprenderá también formas en las que pueden estar adicionalmente presentes otras modificaciones post-traduccionales. Se sabe que la tubulina alfa y beta, que forman la base para la tubulina acetilada, existen en múltiples variantes, subtipos e isoformas, así como que existen múltiples genes de tubulina alfa y beta que dan lugar los mismos. Preferiblemente, la tubulina que está acetilada se relaciona con variantes, subtipos e isoformas humanos de tubulina alfa y beta, más preferiblemente con variantes, subtipos e isoformas humanos de tubulina alfa. Los subtipos de la tubulina alfa incluyen, pero no se limitan a, la tubulina alfa 1A, tubulina alfa 1 B, tubulina alfa 1C, tubulina alfa 2, tubulina alfa 3C/D, tubulina alfa 4A y la isoforma 1 de la cadena de la tubulina alfa 8. Los subtipos tubulina alfa 1A, tubulina alfa 1 B, tubulina alfa 1C, tubulina alfa 2, tubulina alfa 3C/D y tubulina alfa 4A poseen una lisina 40 y, por lo tanto, son un subconjunto preferido de tubulinas alfa de acuerdo con la invención. Los subtipos de

5 tubulina beta incluyen, pero no se limitan a, la cadena de la tubulina beta, la cadena de la tubulina beta 1 y la isoforma 1 de la cadena de la tubulina beta 3. Se puede acceder a las secuencias proteicas de los subtipos de la tubulina alfa mediante los siguientes números de referencia del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) NP_006000, NP_006073, NP_116093, ABD72607, NP_005992, NP_005991 y NP_061816, y se puede acceder a los subtipos de la tubulina beta mediante NP_821133, NP_110400 y NP_006077 respectivamente. En una realización preferida de forma alternativa, la tubulina que se acetila se selecciona del grupo que consiste en tubulina alfa 1C (NP_116093.1), tubulina alfa 3C/D (NP_005992.1), tubulina alfa 4A (NP_005991.1), isoforma 1 de la cadena de la tubulina alfa 8 (NP_061816.1), cadena de la tubulina beta (NP_821133.1) e isoforma 1 de la cadena de la tubulina beta 3 (NP_006077.2). Las secuencias de polipéptidos de estas también se enumeran en las Figuras 9-14 como SEQ ID NO. 1-6, respectivamente. En particular, la tubulina que se acetila se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en tubulina alfa 1C, tubulina alfa 3C/D, tubulina alfa 4A e isoforma 1 de la cadena de la tubulina alfa 8. Más concretamente, la tubulina que se acetila se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en tubulina alfa 1C, tubulina alfa 3C/D y tubulina alfa 4A.

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



en donde

R representa fenilo, tienilo o piridinilo

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, fenilalcoxi 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;

25 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;

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

30 o R⁴ y R⁵ juntos representan metilendioxi;

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

o en donde

35 R representa fenilo o piridinilo

40 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, fenilalcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman junto con el nitrógeno un heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, formilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi;

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

X representa oxígeno;

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxi-alquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

5 o R⁴ y R⁵ 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,

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

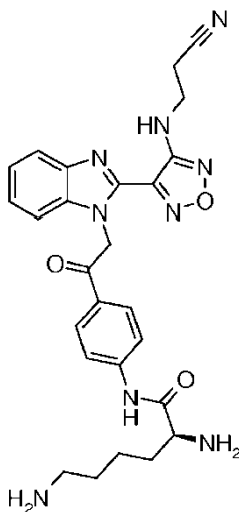
La respuesta es de una enfermedad en un sujeto. Preferiblemente, la respuesta puede ser para el tratamiento, es decir, para el tratamiento con el compuesto de fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos.

15 El biomarcador tubulina acetilada 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 como se define en las reivindicaciones se refiere al uso *ex vivo* de tubulina acetilada 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.

20 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 hidroxiácidos pegilados. Más preferiblemente, el pro-fármaco es una amida formada a partir de un grupo amino presente en el grupo R del compuesto de fórmula general I y el grupo carboxi de glicina, alanina o lisina.

25 De manera particularmente preferible el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, preferiblemente una sal hidrocioruro, lo más preferiblemente una sal dihidrocioruro del mismo.

30 Otro aspecto de la presente invención como se define en la reivindicación 17 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 tubulina acetilada en una muestra pre-obtenida del sujeto para obtener un valor o valores que representan esta concentración; y

b) comparar el valor o los valores de la etapa a) con un valor estándar o un conjunto de valores estándar o concentraciones de inicio pre-tratamiento. Detalles adicionales de este método se describen en la reivindicación 17.

Además, la respuesta que se debe prever es la resistencia.

5 La medición de una concentración o concentraciones de tubulina acetilada 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.

10 En una realización preferida, una mayor concentración de tubulina acetilada en la muestra del sujeto con relación al valor estándar o conjunto de valores estándares o concentraciones inicio de pre-tratamiento predice resistencia.

15 La enfermedad es cáncer. De manera especialmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer 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, leucemia de células T y sarcomas. De manera más especialmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de ovario, leucemia de células T y cáncer de pulmón. En una realización especialmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de ovario y leucemia de células T.

20 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 tubulina acetilada 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 la tubulina acetilada en dicha muestra no es mayor que un valor estándar o un conjunto de valores estándares o concentraciones inicio de pre-tratamiento.

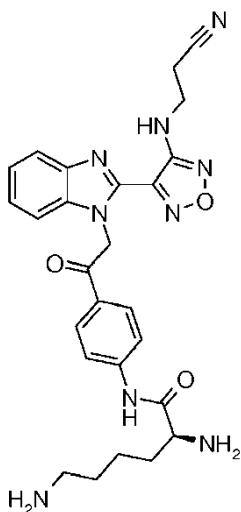
25 La tubulina acetilada se puede utilizar en el tratamiento de una enfermedad neoplásica o autoinmune, preferiblemente cáncer, en donde una concentración de tubulina acetilada en una muestra del sujeto se mide para obtener un valor o valores que representan esta concentración, y el sujeto es tratado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

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

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

40 En aún otro aspecto, la invención como se define en la reivindicación 20 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 una concentración de tubulina acetilada 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 tubulina acetilada en la muestra se compara como se define adicionalmente en la reivindicación 20.

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



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

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

- 5 En una realización preferida, los reactivos en el kit comprenden un reactivo de captura que comprende un detector para tubulina acetilada, 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 tubulina acetilada es mayor en relación con un valor estándar o un conjunto de valores estándares o concentraciones de inicio de pre-tratamiento. 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

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

Fig. 1A y 1B: células de NSCLC A549;

Fig. 1C y 1D: células de cáncer cervical HeLa;

- 20 Fig. 1E y 1F: células de cáncer de mama SKBR3

Tratamiento con control de vehículo: Figuras 1A, 1C y 1E,

tratamiento con BAL27862: Figuras 1B, 1D y 1F.

- 25 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.

Fig. 2A: tratamiento con 20 nM de Compuesto C

Fig. 2B: tratamiento con 80 nM de Compuesto B

- 30 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 μ m, se procesaron utilizando el software ImageJ.

- 35 Figura 4: Muestra una comparación del tratamiento de células de NSCLC A549 con BAL27862 en comparación con nocodazol. Microtúbulos de células mitóticas o detenidas G2/M fueron teñidos después de 24 h de tratamiento con diversas concentraciones de nocodazol (B, C y D) y BAL27862 (E, F y G). A: control, B: Nocodazol 50 nM, C: Nocodazol 100 nM, D: Nocodazol 200 nM, E: BAL27862 20 nM; F: BAL27862 30 nM y G: BAL27862 50 nM. La barra

de escala blanca representa 10 micrómetros. Se muestran imágenes representativas de los fenotipos de microtúbulos observados.

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

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;

10 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;

15 Fig. 5I: Tratamiento con BAL27862 durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales paclitaxel.

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.

20 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;

25 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;

30 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;

35 Figura 7: Muestra las líneas de células tumorales que han sido seleccionados en cuanto a la resistencia a BAL27862 a través de cultivo *in vitro* en presencia del compuesto. Sobre la base de determinaciones de CI_{50} (para la proliferación: A549, SKOV3, H460) o CE_{50} (para la muerte celular: Jurkat), factores de resistencia de BAL27862 frente a líneas parentales fueron: A549 (3,0 veces); SKOV3 (7,6 veces - resistente a 1 línea); Jurkat (22,5 veces), H460 (5,3 veces) (véase la Tabla 1). Extractos de proteínas de células enteras se han preparado a partir de líneas parentales y resistentes y se han analizado por inmunotransferencia para la expresión de tubulina acetilada. Las concentraciones de actina se incluyeron como control de carga.

40 Figura 8: Muestra que concentraciones incrementadas de proteínas tubulina acetilada se mantienen en líneas tumorales SKOV3 durante el desarrollo de la resistencia. Se seleccionaron líneas de células tumorales SKOV3 para la resistencia a BAL27862 a través de cultivo *in vitro* en presencia de BAL27862 para aumentar los períodos de tiempo. Sobre la base de 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). Extractos de proteínas de células enteras se prepararon a partir de líneas parentales y resistentes y se analizaron por inmunotransferencia para la expresión de tubulina acetilada. Las concentraciones de actina actúan como un control de la carga.

5 Figura 9: Muestra la secuencia de proteínas de la cadena de tubulina alfa-1C [Homo sapiens] (SEQ. ID. No.1)

Figura 10: Muestra la secuencia de proteínas de la cadena de tubulina alfa-3C/D [Homo sapiens] (SEQ. ID. No.2)

Figura 11: Muestra la secuencia de proteínas de la cadena de tubulina alfa-4A [Homo sapiens] (SEQ ID No. 3)

Figura 12: Muestra la secuencia de proteínas de la isoforma 1 de la cadena de tubulina alfa-8 [Homo sapiens] (SEQ ID No. 4)

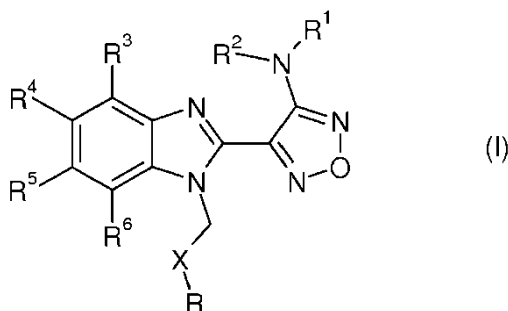
10 Figura 13: Muestra la secuencia de proteínas de la cadena de tubulina beta [Homo sapiens] (SEQ ID No. 5)

Figura 14: Muestra la secuencia de proteínas de la isoforma 1 de la cadena de tubulina beta-3 [Homo sapiens] (SEQ ID No. 6).

Descripción Detallada

Compuestos de fórmula I

15 Los compuestos utilizados en la invención están representados por la fórmula general I:



en donde

R representa fenilo, tienilo o piridinilo

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

25 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 hidroxil o alcoxi inferior;

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxil-alquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

30 o R⁴ y R⁵ juntos representan metilendioxi;

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

o en donde

35 R representa fenilo o piridinilo,

en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxil-alquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxil,

5 alcoxi inferior, hidroxi-alcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenil-alcoxi inferior, alquil inferior-carbonilo, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman junto con el nitrógeno un heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, formilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi;

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

X representa oxígeno;

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxi-alquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

10 R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

o R⁴ y R⁵ 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;

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

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

25 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 R¹ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, acetilo, CH₂CH₂CN y CH₂CH₂CH₂OH.

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

30 4-(1-fenacil-1H-bencimidazol-2-il)-furazan-3-ilamina,

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

N-{4-[1-(4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-il}-acetamida,

4-[1-(4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-il-N-(2-cianoetil)-amina

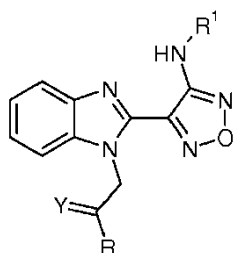
4-[1-(4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-il-N-(3-hidroxiopropil)-amina,

35 4-[1-(3-amino-4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-ilamina

4-[1-(3-metoxi-4-metoximetoxi-fenacilo)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-ilamina,

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

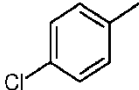
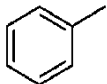
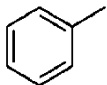
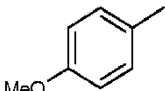
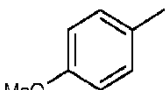
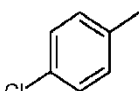
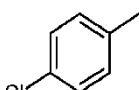
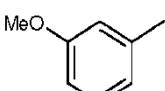
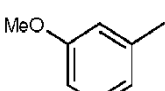
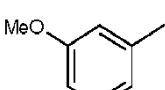
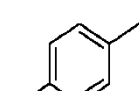
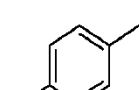
En otra realización preferida, el compuesto de fórmula general I se selecciona del grupo que consiste en:



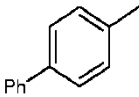
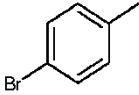
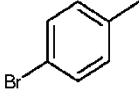
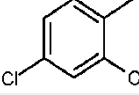
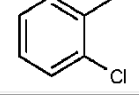
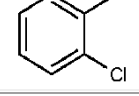
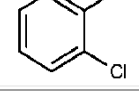
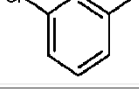
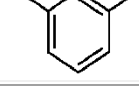
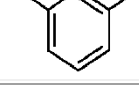
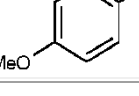
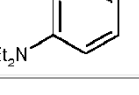
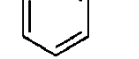
ES 2 621 413 T3

en donde

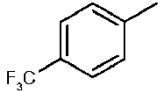
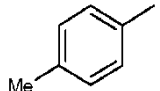
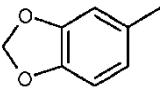
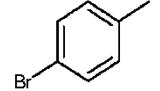
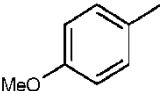
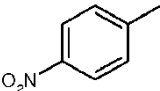
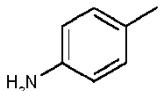
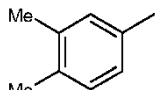
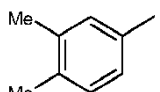
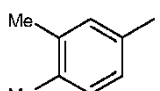
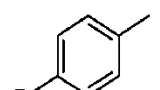
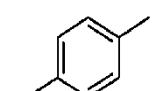
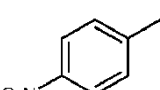
R, Y y R¹ se definen como sigue:

R	Y	R ¹
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	O	H
	NOH	H
	NOH	H
	NOMe	H
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	O	H
	NOH	H

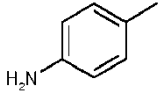
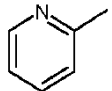
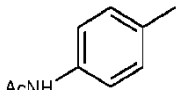
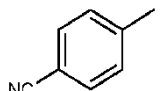
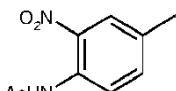
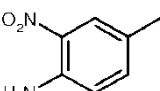
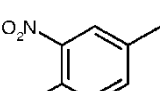
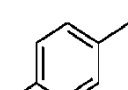
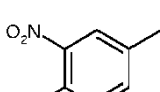
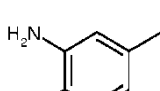
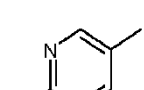
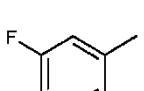

ES 2 621 413 T3

R	Y	R ¹
	NOMe	H
	O	H
	NOMe	H
	O	H
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	NOMe	H
	O	H
	O	Ac

ES 2 621 413 T3

R	Y	R ¹
	O	H
	O	H
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	CH ₂ CH ₂ CN

ES 2 621 413 T3

R	Y	R ¹
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	H
	O	H

R	Y	R ¹
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN

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

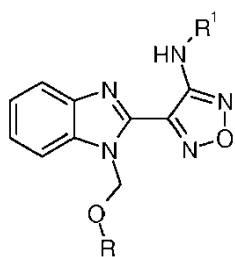
Aún en una realización preferida, el compuesto de fórmula general I se selecciona del grupo que consiste en:

4-(1-fenoximetil-1H-bencimidazol-2-il)-furazan-3-ilamina,

4-[1-(4-fluorofenoximetil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-ilamina,

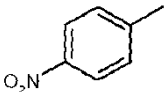
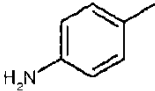
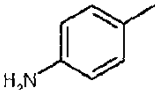
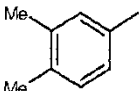
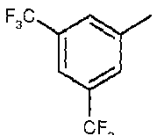
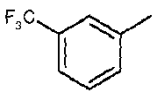
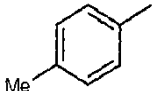
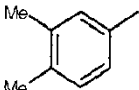
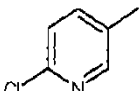
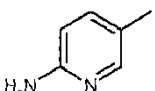
5 4-[1-(3,4-dimetilfenoximetil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-il-N-(2-cianoetil)-amina

y compuestos representados por la fórmula:



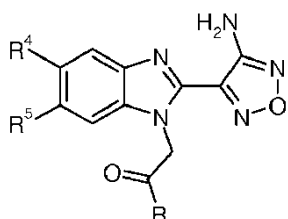
en donde R y R¹ son como se definen a continuación

R	R ¹
	H
	H
	H
	H
	H
	CH ₂ CH ₂ CN
	CH ₂ CH ₂ CN
	CH ₂ CH ₂ CN
	H
	H

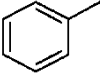
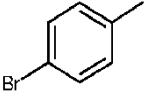
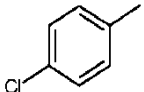
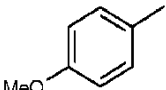
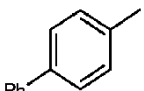
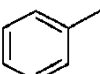
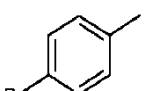
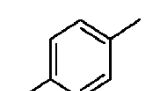
R	R ¹
	H
	H
	H
	H
	H
	H
	CH ₂ CH ₂ CN
	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH
	H
	H

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

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

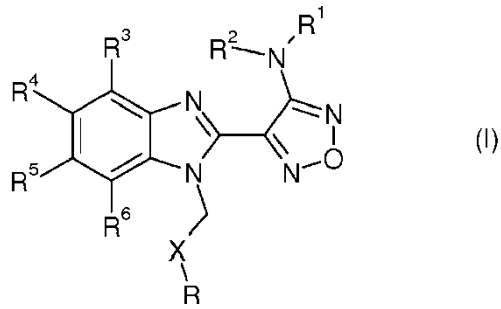


en donde R, R⁴ y R⁵ son como se definen a continuación

R	R ⁴	R ⁵
	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;

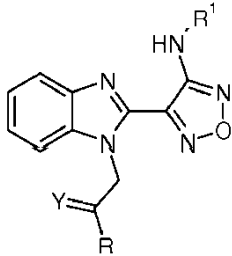
R¹ representa hidrógeno o ciano- alquilo inferior;

R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ representan hidrógeno;

10 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

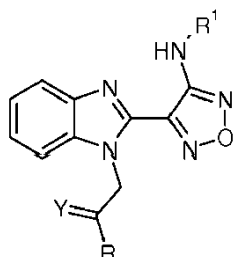


15 en donde R, Y y R¹ se definen como sigue:

R	Y	R ¹
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ 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

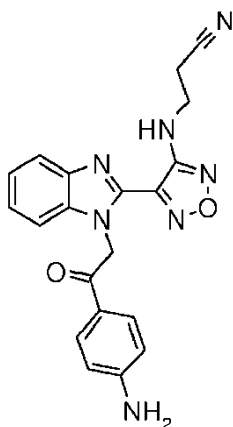


en donde R, Y y R¹ se definen como sigue:

R	Y	R1
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ 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.

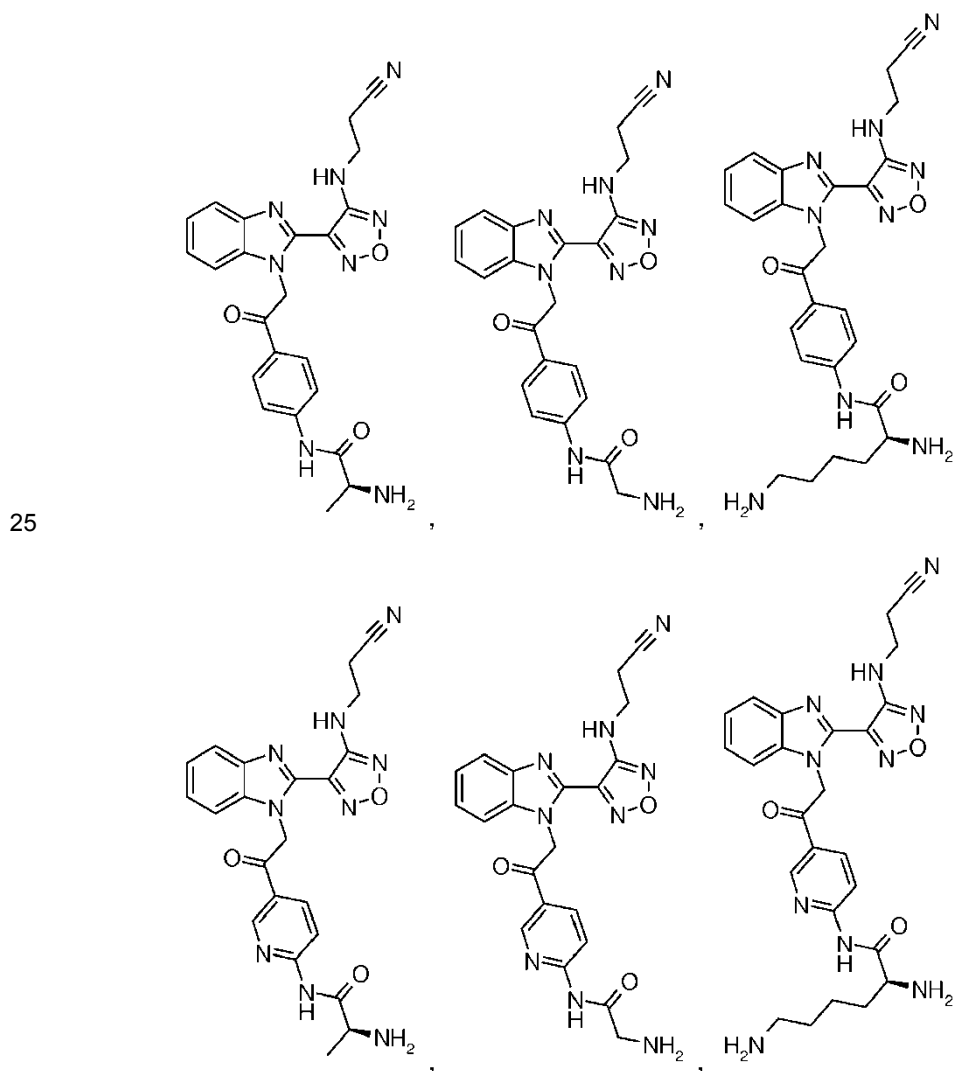
10 El término derivado o derivados en la frase "derivado farmacéuticamente aceptable" o "derivados farmacéuticamente aceptables" de los compuestos de fórmula general I se refiere a sales, solvatos y complejos de los mismos y a solvatos y complejos de sales de los mismos, así como a pro-fármacos tal como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

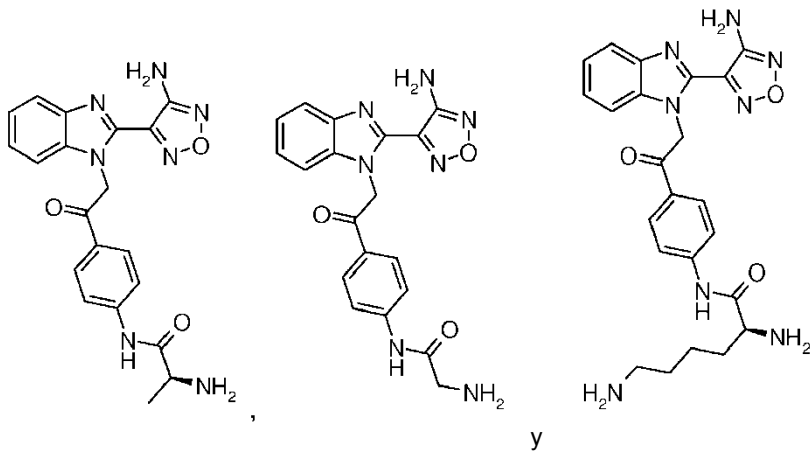
15 Las sales son preferiblemente sales por adición de ácidos. Las sales se forman, preferiblemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, a partir de compuestos de fórmula (I) con un átomo de nitrógeno de carácter básico, especialmente las sales farmacéuticamente aceptables. Ácidos inorgánicos adecuados 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

- 5 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.
- 10 El compuesto de fórmula (I) se puede administrar en forma de un pro-fármaco que se descompone en el cuerpo humano o animal para dar el compuesto de la fórmula I. Los pro-fármacos son ésteres y amidas hidrolizables in vivo de un compuesto de la fórmula I. Pro-fármacos particulares considerados son ésteres y amidas de aminoácidos que se producen de forma natural y ésteres o amidas de péptidos pequeños, en particular péptidos pequeños que consisten en hasta cinco, preferiblemente en dos o tres aminoácidos, así como ésteres y amidas de hidroxiaácidos pegilados, preferiblemente ácido hidroxi-acético y ácido láctico. Ésteres de pro-fármacos se forman a partir de la función ácido del aminoácido o el extremo C del péptido y grupo o grupos 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.
- 15
- 20

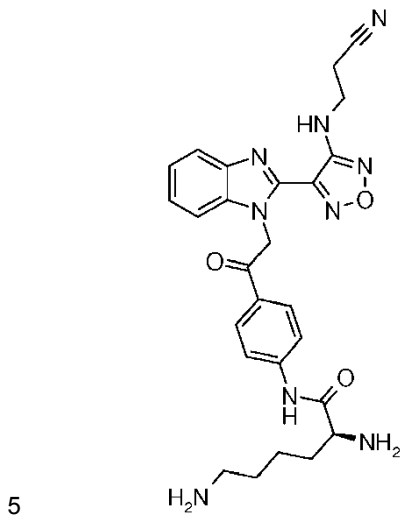
Más preferiblemente, el pro-fármaco se forma por la adición de glicina, alanina o lisina al compuesto de fórmula I.

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

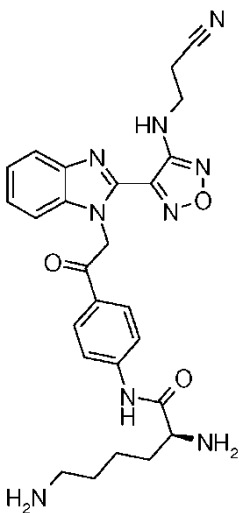




En una realización especialmente preferida, el compuesto de fórmula general I está en forma de un pro-fármaco que tiene la siguiente fórmula

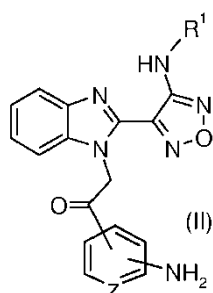


En una realización más especialmente preferida, el compuesto es una sal preferiblemente una sal hidroc্লoruro, lo más preferiblemente una sal dihidroc্লoruro, de un compuesto de la siguiente fórmula



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

10 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)

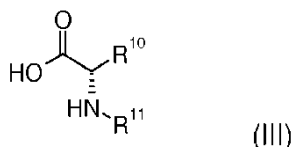


(II)

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)



(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 base adecuada, en particular una base aromática tal como piridina o colidina o una base de amina terciaria tal como trietilamina o diisopropiltilamina, o una sal inorgánica de carácter básico, p. ej., carbonato de potasio o de sodio.

- 20 La acilación puede llevarse a cabo en las condiciones utilizadas para la formación de amidas conocida per se en la química de los péptidos, p. ej., con agentes activantes para el grupo carboxi tales como carbodiimidas tales como N,N'-dietil-, N,N'-dipropil-, N,N'-diisopropil-, N,N'-diclohexil-carbodiimida e hidrocloreto de N-(3-dimetilaminoisopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), o con agentes tales como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)-fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de O-(7-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 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.

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

- 40 Los grupos protectores pueden estar ya presentes en precursores y deben proteger a los grupos funcionales en cuestión frente a reacciones secundarias no deseadas tales como alquilaciones, acilaciones, eterificaciones, esterificaciones, oxidaciones, solvolisis y reacciones similares. Es una característica de los grupos protectores que

se prestan fácilmente, es decir, sin reacciones secundarias no deseadas, a la separación, típicamente por solvólisis, 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 muerte celular, por ejemplo por apoptosis.

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

El cáncer se asocia con tasas de proliferación celular y muerte celular anormales. Dado que la apoptosis es inhibida o retrasada en la mayoría de los tipos de enfermedades proliferativas, neoplásicas, la inducción de la apoptosis es una opción para el tratamiento del cáncer, especialmente en tipos de cáncer que muestran resistencia a la quimioterapia clásica, la radiación y la inmunoterapia (Apoptosis and Cancer Chemotherapy, Hickman y Dive, comps., Blackwell Publishing, 1999). También en enfermedades y patologías autoinmunes y relacionadas con el trasplante se puede utilizar compuestos que inducen la apoptosis para restablecer los procesos de muerte celular normal y, por lo tanto, pueden erradicar los síntomas y podrían curar las enfermedades. Otras aplicaciones de compuestos que inducen la apoptosis pueden ser la restenosis, es decir, la acumulación de células de la musculatura lisa vascular en las paredes de las arterias, y en infecciones persistentes provocadas por un fallo de erradicar células infectadas por bacterias y virus. Además, la apoptosis puede ser inducida o restablecida en células epiteliales, en células endoteliales, en las células de la musculatura y en otras que han perdido contacto con la matriz extracelular.

Un compuesto de acuerdo con la fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se puede usar para el tratamiento profiláctico o especialmente terapéutico del cuerpo humano, en particular para el tratamiento de una enfermedad neoplásica, enfermedad autoinmune, patología relacionada con el trasplante y/o enfermedad degenerativa. Ejemplos de tales enfermedades neoplásicas incluyen, pero no se limitan a neoplasias epiteliales, neoplasias de células escamosas, neoplasias de células basales, papilomas de células de transición y carcinomas, adenomas y adenocarcinomas, neoplasias 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, mesonefomas, tumores de los vasos sanguíneos, tumores de los vasos linfáticos, neoplasias óseas y condromatosas, tumores de células gigantes, tumores óseos misceláneos, tumores odontogénicos, gliomas, neoplasias neuroepiteliomatosas, meningiomas, tumores de la vaina nerviosa, tumores de células granulares y sarcomas de las partes blandas alveolares, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, otras neoplasias linforreticulares, tumores de células plasmáticas, tumores de mastocitos, enfermedades inmunoproliferativas, leucemias, trastornos mieloproliferativos misceláneos, trastornos linfoproliferativos y síndromes mielodisplásicos.

Los compuestos de fórmula I general o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se pueden utilizar para tratar enfermedades autoinmunes. Ejemplos de tales enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a lupus eritematoso cutáneo sistémico, discoide o subagudo, artritis reumatoide, síndrome antifosfolípido, CREST, esclerosis sistémica progresiva, enfermedad mixta del tejido conjuntivo (síndrome de Sharp), síndrome de Reiter, artritis juvenil, enfermedad de aglutinina fría, crioglobulinemia mixta esencial, fiebre reumática, espondilitis anquilosante, poliartritis crónica, miastenia grave, esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Guillan-Barre, dermatomiositis/polimiositis, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica, neutropenia, diabetes mellitus tipo I, tiroiditis (incluida la enfermedad de Hashimoto y de Grave), enfermedad de Addison, síndrome poliglandular, pénfigo (vulgar, foliáceo, sebáceo y vegetante), penfigoide

ampollosa 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 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, leucemia de células T y sarcomas. De manera más especialmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de ovario, leucemia de células T y cáncer de pulmón. En una realización especialmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de ovario y leucemia de células T.

Muestras

La medición de la concentración de tubulina acetilada 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 o células tumorales circulantes. 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 tubulina acetilada 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, biopsia de núcleo o biopsia con aguja fina de aspiración, biopsia endoscópica o biopsia superficial. La 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.

El biomarcador tubulina acetilada 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.

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

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

10 Tal como se utiliza en esta memoria, un aumento o concentraciones relativamente altas o altas o mayores en relación con una concentración estándar o conjunto de concentraciones estándares significa la cantidad o concentración del biomarcador en una muestra es detectablemente mayor en la muestra con relación a la concentración estándar o conjunto de concentraciones estándares. Esto abarca al menos un incremento de, o una concentración mayor que, aproximadamente 1% con relación al estándar, preferiblemente al menos un aumento de aproximadamente 5% con relación al estándar. Más preferiblemente, es un incremento de, o una concentración mayor que, al menos aproximadamente 10% con relación al estándar. De manera más particularmente preferida, es un incremento de, o una concentración mayor que, al menos aproximadamente 20% con relación al estándar. Por ejemplo, un incremento de, o una concentración mayor que, puede incluir, pero no se limita a, al menos aproximadamente 1%, aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 50%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 100%, aproximadamente 150% o aproximadamente 200% o más con respecto a la norma.

20 Preferiblemente, concentraciones más altas de tubulina acetilada 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

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

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

son predictivas de resistencia.

Más preferiblemente, concentraciones más altas de tubulina acetilada 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;

son predictivas de resistencia.

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

40 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 tomados 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 tomadas 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 sangre, siempre que el origen de la muestra sea consistente entre el patrón y la muestra a comparar.

45 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 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 tomados a partir de células o tejidos normales, el valor estándar o un conjunto de valores estándares puede ser establecido 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 tomado de al menos un sujeto y más preferiblemente de una media de sujetos (p. ej., n = 2 hasta 1000 o más). El valor estándar o conjunto de valores estándares puede entonces ser correlacionado con los datos de respuesta de las mismas líneas celulares, o mismos sujetos, al tratamiento con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. A partir de esta correlación, se puede establecer un módulo de comparador, por ejemplo, en forma de una escala o sistema de puntuación relativo, incluyendo opcionalmente los valores de corte o umbrales, que indique las concentraciones de biomarcador asociadas con un espectro de niveles de respuesta para el compuesto de fórmula I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. El espectro de niveles de respuesta puede comprender la sensibilidad relativa con la actividad terapéutica del compuesto, (p. ej., alta sensibilidad a baja sensibilidad), así como la resistencia a la actividad terapéutica. En una realización preferida, este módulo de comparador comprende un valor de corte o conjunto de valores que predice resistencia al tratamiento.

Por ejemplo, si se utiliza un método inmunohistoquímico para medir la concentración de tubulina acetilada 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 tubulina acetilada. El sistema también puede tener en cuenta la intensidad relativa de la tinción en las células individuales. Los valores estándares o el conjunto de valores estándares de la concentración de tubulina acetilada 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 terapéutica de un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. El espectro de niveles de respuesta puede comprender la sensibilidad con respecto a la actividad terapéutica del compuesto (p. ej., alta sensibilidad a baja sensibilidad), así como la resistencia a la actividad terapéutica. Los datos de respuesta pueden ser monitoreados, por ejemplo, en términos de: tasas de respuesta objetiva, tiempo hasta la progresión de la enfermedad, progresión de la supervivencia libre y la supervivencia global.

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

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.

- 5 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.

10 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.

15 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) Análisis FAC de células marcadas con fluorescencia (por ejemplo, células que expresan GFP [proteína fluorescente verde]). Las células muertas o que están muriendo presentan una señal de fluorescencia menor en comparación con las células vivas, lo que permite la cuantificación de la inducción de muerte celular. E) 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. F) 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. G) 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. H) 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. I) 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. J) 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.

Tubulina acetilada

Ejemplos preferidos de la secuencia de proteínas de la tubulina alfa y beta (tubulina alfa y beta humana) se enumeran en SEQ. ID NO. 1-6, Figuras 9-14. Tubulina alfa o beta, especialmente tubulina alfa, es un precursor de tubulina acetilada. Como se ha descrito anteriormente, un residuo específico de lisina en la cadena de tubulina se puede acetilar o desacetilar. El término tubulina acetilada también abarca homólogos, formas mutantes, variantes alélicas, isoformas, variantes de corte y empalme y equivalentes de las secuencias representadas por SEQ ID NO 1-6, con la condición de que se acetile un residuo de lisina en la secuencia. Más preferiblemente abarca secuencias que tienen al menos aproximadamente 75% de identidad, de manera especialmente preferida al menos aproximadamente 85% de identidad, con especial preferencia al menos aproximadamente 95% de identidad, y de manera más particularmente preferida aproximadamente 99% de identidad con dichas secuencias, en cada caso con la condición de que se acetile un residuo de lisina en la secuencia. De manera particularmente preferida se acetila la lisina 40 de la tubulina alfa.

Concentración de tubulina acetilada

La concentración de tubulina acetilada puede someterse a ensayo en la muestra mediante técnicas de análisis de proteínas bien conocidas para una persona experta. Ejemplos de métodos conocidos en la técnica que son adecuados para medir la concentración de tubulina acetilada 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 espectrometría de masas de ionización por electroproyección (ESI-MS).

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

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.

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.

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

El biomarcador puede ser utilizado 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.

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. Preferiblemente, las concentraciones de un biomarcador de este tipo se pueden utilizar para identificar a los sujetos susceptibles 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 mayor concentración de tubulina acetilada, 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. Más particularmente, el biomarcador se puede utilizar para identificar a sujetos de los que una muestra o muestras no exhiben una mayor concentración de tubulina acetilada, con relación a una concentración medida antes de iniciar el tratamiento, después de lo cual esos sujetos pueden entonces ser seleccionados para continuar 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.

La tubulina acetilada 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.

10 Método de tratamiento

En un método de tratamiento y en tubulina acetilada para uso en un método de tratamiento, la concentración de tubulina acetilada 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 tubulina acetilada en dicha muestra no es mayor que un valor estándar o un conjunto de valores estándares o no ha aumentado 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 tubulina acetilada en un sujeto que tiene una muestra con una mayor concentración de tubulina acetilada en comparación con una concentración estándar o un conjunto de concentraciones estándares o concentraciones de inicio del pre-tratamiento, y 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 tubulina acetilada puede ser reducida por medios químicos o genéticos directos o indirectos. Ejemplos de tales métodos son el tratamiento con un fármaco que resulta en una expresión reducida de tubulina acetilada, la administración dirigida de construcciones virales, de plásmidos o de péptidos, o anticuerpo o ARNip o antisentido para regular a la baja la concentración de tubulina acetilada. Por ejemplo, ARNip se puede utilizar para reducir la concentración de alfaTAT1 o el suministro de un plásmido se puede utilizar para aumentar la expresión de sirT2 y, por lo tanto, reducir la concentración de tubulina acetilada en la célula. El sujeto puede entonces ser tratado con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

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

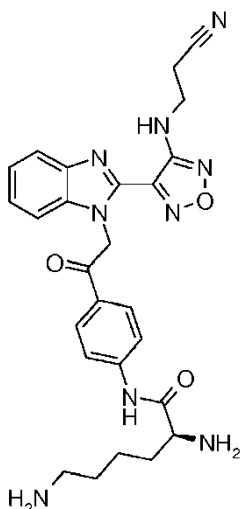
Kit

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

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

Los reactivos son preferiblemente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen selectivamente a la tubulina acetilada. Estos puede estar, por ejemplo, en forma de un anticuerpo primario específico que se une a la tubulina acetilada y un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario, y que es en sí mismo marcado para la detección. Alternativamente, 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.

El kit de acuerdo con la invención se puede utilizar en el método de tratamiento tal como se define anteriormente. Comprende un compuesto de la siguiente fórmula o una sal farmacéuticamente aceptable



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

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

Metodología experimental

Tinción inmunofluorescente de células cultivadas

Células de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas A549 (NSCLC, número de referencia ATCC CCL-185), células de cáncer cervical HeLa (número de referencia ATCC CCL-2) y células de carcinoma de mama SKBR3 (ATCC número de referencia HTB-30) se sembraron a densidades de 50% en cubreobjetos de microscopio redondos y se cultivaron durante 24 horas en RPMI-1640 que contiene FCS al 10% (al que también se alude como FBS) a 37°C, 5% de CO₂. Los compuestos a ensayar se disolvieron en DMSO. El medio de cultivo celular se reemplazó por medio que contiene el o los compuestos diluidos (paclitaxel, vinblastina, colchicina y nocodazol se adquirieron de Sigma-Aldrich) o vehículo. Después del tratamiento durante los tiempos indicados en la Breve Descripción de las Figuras, los cubreobjetos se lavaron y las células se fijaron en metanol/acetona (1:1) durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron en tampón de bloqueo (BSA al 0,5% y TX-100 al 0,1% en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas luego con anticuerpo 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.

Generación y Ensayo de Cristal Violeta o de Muerte Celular de Líneas Celulares Resistentes a BAL27862

Sub-líneas resistentes a BAL27862 de líneas celulares 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) y de leucemia de células T (Jurkat referencia ATCC TIB-152) fueron generadas mediante selección a largo plazo en medio de cultivo celular completa (RPMI-1640 que contiene FBS al 10%; Sigma-Aldrich) aumentando de manera gradual las concentraciones 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_{50} o CE_{50} de la línea celular resistente frente a la CI_{50} o CE_{50} de la línea celular parental correspondiente) entre 3 y 22,5. Los factores de Resistencia se determinaron para las líneas celulares adherentes H460, A549 y SKOV3 midiendo la proliferación utilizando el ensayo del cristal violeta, mientras que para la línea celular de Jurkat se midió la muerte celular utilizando FACS. 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 A549 (2000 células/pocillo), H460 (1000 células/pocillo) y SKOV3 (2000 células/pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas de incubación, las células 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 μ l 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 μ l 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).

Las células Jurkat que expresaron GFP (proteína fluorescente verde) de forma estable se incubaron con concentraciones cada vez mayores de BAL27862 en medio de cultivo durante 72 horas y a continuación se analizaron mediante FACS (excitación a 488 nm, emisión a 525 nm). Se cuantificaron las células muertas o que estaban muriendo, que presentaban una actividad de fluorescencia menor en comparación con las células vivas (*Green fluorescent protein as a novel tool to measure apoptosis and necrosis*. Strebel et al, 2001, Cytometry 43(2): 126-133).

Valores CI_{50} anti-proliferativos y valores CE_{50} de muerte celular se calcularon a partir de curvas de concentración-respuesta utilizando el software GraphPad Prism. Los factores de resistencia se calcularon como una relación de CI_{50} o CE_{50} en la variante de la línea resistente frente a la CI_{50} o CE_{50} en la línea parental.

Análisis de Proteínas

Las células se lavaron con PBS enfriado con hielo que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y con un tampón enfriado con 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 μ g/mL), aprotinina (10 μ g/mL) y PMSF 1 mM. Las células se extrajeron en el mismo tampón que contenía NP40 al 1%. Después de la homogeneización, los lisados se clarificaron mediante centrifugación y se congelaron a -80°C.

La concentración de proteína se determinó con el ensayo de proteínas BCA (Pierce). La inmunotransferencia se realizó utilizando 20 μ g de proteína total por pista. 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). La acetilación de la tubulina se midió utilizando un anticuerpo anti-tubulina acetilada monoclonal de ratón (Sigma, número de referencia T7451): dilución 1:10.000 en PBS con leche al 5% / Tween al 0,1%. El anticuerpo de actina utilizado fue uno monoclonal de ratón (Chemicon, número de referencia MAB1501): dilución 1:5000 en PBS con leche al 5% / Tween al 0,1%. El anticuerpo secundario utilizado para la inmunotransferencia fue anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories INC: # 115-035-146 JIR), utilizado con una dilución de 1:5000 en PBS más leche al 0,5 % y Tween al 0,1%. Las bandas marcadas se revelaron utilizando el sistema de formación de imágenes de alto rendimiento Raytest Stella 3200.

Ejemplos detallados

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

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

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

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

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

Ejemplos detallados de acuerdo con la invención

Ejemplo 3: Se observa una expresión aumentada de tubulina acetilada en líneas tumorales seleccionadas para la resistencia a un compuesto de fórmula general I

La selección *in vitro* para la resistencia a BAL27862 dio lugar a la generación de 4 líneas de células tumorales relativamente resistentes, con los siguientes factores de resistencia *frente a* las líneas parentales (basada en determinaciones de CI_{50} [A549, SKOV3, H460] o de CE_{50} [Jurkat] utilizando el ensayo de Cristal Violeta o el ensayo de muerte celular FAC, respectivamente): A549 (3,0 veces); resistente 1 a SKOV3 (7,6 veces); resistente 2 a SKOV3 (11,6 veces); H460 (5,3 veces); Jurkat (22,5 veces) (Tabla 1).

Tabla 1:

Compuesto para el tratamiento	Factores de resistencia (relación de CI_{50} o CE_{50} de variante de línea celular resistente a BAL27862 frente a la CI_{50} o CE_{50} de línea celular parental)				
	A549	H460	resistente 1 a SKOV3	resistente 2 a SKOV3	Jurkat
BAL27862	3,0	5,3	7,6	11,6	22,5
Colchicina	0,9	1,6	2,0	2,8	nd
Nocodazol	1,6	1,3	3,6	3,9	nd
Vinblastina	2,3	4,6	15,7	17,8	nd
Paclitaxel	0,06	0,3	0,4	0,5	nd

nd: no determinado

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

La extracción y el análisis de inmunotransferencia de estas líneas para medir las concentraciones de tubulina acetilada, seguido de la comparación con los datos de resistencia a BAL27862 (Tabla 1), demuestran que la tubulina acetilada es mayor en las líneas resistentes, en comparación con las líneas parentales (Figura 7). Esto se mantuvo a lo largo del desarrollo de resistencia en las células SKOV3 (Figura 8). Estos datos demuestran la asociación de los niveles incrementados de expresión de tubulina acetilada con la resistencia adquirida a BAL27862.

Lista de abreviaturas

- A549 línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humana
- alfaTAT1 tubulina alfa N-acetiltransferasa 1
- BCA ácido bicinconínico
- BrdU bromodesoxiuridina
- BSA albúmina de suero bovino

ES 2 621 413 T3

	CA-125	antígeno de cáncer 125
	CCD	dispositivo acoplado a carga
	ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
	CREST	síndrome de esclerodermia limitada
5	DMSO	dimetilsulfóxido
	ADN	ácido desoxirribonucleico
	dUTP	2'-desoxiuridina 5'-trifosfato
	EDTA	ácido etilendiamintetraacético
	EGTA	ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético
10	ELISA	ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas
	Elp3	proteína del complejo elongador 3
	ESI-MS	espectrometría de masas por ionización por electroproyección
	FACS	exploración/clasificación de células activadas por fluorescencia
	FCS/FBS	suero de ternera fetal / bovino fetal
15	G2/M	transición de G2 a la fase mitótica del ciclo celular
	GFP	proteína fluorescente verde
	HDAC6	histona desacetilasa 6
	HeLa	línea celular de cáncer de células escamosas humana
	HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
20	IHC	inmunohistoquímica
	ISET	Aislamiento por tamaño de células tumorales epiteliales
	Jurkat	línea celular de leucemia de células T humana
	MAB	anticuerpo monoclonal
25	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
	MDR1	proteína resistente a múltiples fármacos
	ARNm	ácido ribonucleico mensajero
30	MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
	NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología
	NSCLC	cáncer de pulmón de células no pequeñas
	NP40	Nonidet P40
	PBS	solución salina tamponada con fosfato
35	P-gp	glicoproteína P
	PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
	PSA	antígeno específico de la próstata

ES 2 621 413 T3

	PVDF	poli(fluoruro de vinilideno)
	RANO	evaluación de la respuesta para gliomas de alto grado
	RECIST	criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos
5	RPMI-1640	medio de cultivo celular utilizado para el cultivo de células eucarióticas y líneas celulares transformada y no transformadas
	SDS	dodecilsulfato de sodio
	SEQ. ID NO.	número de identificación de la secuencia
	ARNip	ácido ribonucleico inhibidor pequeño
	Sirt2	desacetilasa sirtuína 2 dependiente de NAD
10	SKBR3	línea celular de carcinoma mamario humano
	SKOV3	línea celular de carcinoma de ovario humano
	TUNEL	ensayo de marcaje de extremo de corte de dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal
	Tween	polisorbato 20, detergente no iónico
15	TX-100	Triton-X100
	YO-PRO	colorante de ácidos nucleicos de cianina monomérica, fluorescente

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Basilea Pharmaceutica AG

<120> Uso de tubulina acetilada como un biomarcador de la respuesta de fármacos

5 <130> 22040

<160> 6

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 449

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 621 413 T3

Met Arg Glu Cys Ile Ser Ile His Val Gly Gln Ala Gly Val Gln Ile
 1 5 10 15

Gly Asn Ala Cys Trp Glu Leu Tyr Cys Leu Glu His Gly Ile Gln Pro
 20 25 30

Asp Gly Gln Met Pro Ser Asp Lys Thr Ile Gly Gly Gly Asp Asp Ser
 35 40 45

Phe Asn Thr Phe Phe Ser Glu Thr Gly Ala Gly Lys His Val Pro Arg
 50 55 60

Ala Val Phe Val Asp Leu Glu Pro Thr Val Ile Asp Glu Val Arg Thr
 65 70 75 80

Gly Thr Tyr Arg Gln Leu Phe His Pro Glu Gln Leu Ile Thr Gly Lys
 85 90 95

Glu Asp Ala Ala Asn Asn Tyr Ala Arg Gly His Tyr Thr Ile Gly Lys
 100 105 110

Glu Ile Ile Asp Leu Val Leu Asp Arg Ile Arg Lys Leu Ala Asp Gln
 115 120 125

Cys Thr Gly Leu Gln Gly Phe Leu Val Phe His Ser Phe Gly Gly Gly
 130 135 140

Thr Gly Ser Gly Phe Thr Ser Leu Leu Met Glu Arg Leu Ser Val Asp
 145 150 155 160

Tyr Gly Lys Lys Ser Lys Leu Glu Phe Ser Ile Tyr Pro Ala Pro Gln
 165 170 175

ES 2 621 413 T3

Val Ser Thr Ala Val Val Glu Pro Tyr Asn Ser Ile Leu Thr Thr His
180 185 190

Thr Thr Leu Glu His Ser Asp Cys Ala Phe Met Val Asp Asn Glu Ala
195 200 205

Ile Tyr Asp Ile Cys Arg Arg Asn Leu Asp Ile Glu Arg Pro Thr Tyr
210 215 220

Thr Asn Leu Asn Arg Leu Ile Ser Gln Ile Val Ser Ser Ile Thr Ala
225 230 235 240

Ser Leu Arg Phe Asp Gly Ala Leu Asn Val Asp Leu Thr Glu Phe Gln
245 250 255

Thr Asn Leu Val Pro Tyr Pro Arg Ile His Phe Pro Leu Ala Thr Tyr
260 265 270

Ala Pro Val Ile Ser Ala Glu Lys Ala Tyr His Glu Gln Leu Thr Val
275 280 285

Ala Glu Ile Thr Asn Ala Cys Phe Glu Pro Ala Asn Gln Met Val Lys
290 295 300

Cys Asp Pro Arg His Gly Lys Tyr Met Ala Cys Cys Leu Leu Tyr Arg
305 310 315 320

Gly Asp Val Val Pro Lys Asp Val Asn Ala Ala Ile Ala Thr Ile Lys
325 330 335

Thr Lys Arg Thr Ile Gln Phe Val Asp Trp Cys Pro Thr Gly Phe Lys
340 345 350

Val Gly Ile Asn Tyr Gln Pro Pro Thr Val Val Pro Gly Gly Asp Leu
355 360 365

Ala Lys Val Gln Arg Ala Val Cys Met Leu Ser Asn Thr Thr Ala Val
370 375 380

Ala Glu Ala Trp Ala Arg Leu Asp His Lys Phe Asp Leu Met Tyr Ala
385 390 395 400

Lys Arg Ala Phe Val His Trp Tyr Val Gly Glu Gly Met Glu Glu Gly
405 410 415

Glu Phe Ser Glu Ala Arg Glu Asp Met Ala Ala Leu Glu Lys Asp Tyr
420 425 430

ES 2 621 413 T3

Glu Glu Val Gly Ala Asp Ser Ala Asp Gly Glu Asp Glu Gly Glu Glu
435 440 445

Tyr

<210> 2

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 621 413 T3

Met Arg Glu Cys Ile Ser Ile His Val Gly Gln Ala Gly Val Gln Ile
 1 5 10 15

Gly Asn Ala Cys Trp Glu Leu Tyr Cys Leu Glu His Gly Ile Gln Pro
 20 25 30

Asp Gly Gln Met Pro Ser Asp Lys Thr Ile Gly Gly Gly Asp Asp Ser
 35 40 45

Phe Asn Thr Phe Phe Ser Glu Thr Gly Ala Gly Lys His Val Pro Arg
 50 55 60

Ala Val Phe Val Asp Leu Glu Pro Thr Val Val Asp Glu Val Arg Thr
 65 70 75 80

Gly Thr Tyr Arg Gln Leu Phe His Pro Glu Gln Leu Ile Thr Gly Lys
 85 90 95

Glu Asp Ala Ala Asn Asn Tyr Ala Arg Gly His Tyr Thr Ile Gly Lys
 100 105 110

Glu Ile Val Asp Leu Val Leu Asp Arg Ile Arg Lys Leu Ala Asp Leu
 115 120 125

Cys Thr Gly Leu Gln Gly Phe Leu Ile Phe His Ser Phe Gly Gly Gly
 130 135 140

Thr Gly Ser Gly Phe Ala Ser Leu Leu Met Glu Arg Leu Ser Val Asp
 145 150 155 160

Tyr Gly Lys Lys Ser Lys Leu Glu Phe Ala Ile Tyr Pro Ala Pro Gln
 165 170 175

Val Ser Thr Ala Val Val Glu Pro Tyr Asn Ser Ile Leu Thr Thr His
 180 185 190

ES 2 621 413 T3

Thr Thr Leu Glu His Ser Asp Cys Ala Phe Met Val Asp Asn Glu Ala
 195 200 205

Ile Tyr Asp Ile Cys Arg Arg Asn Leu Asp Ile Glu Arg Pro Thr Tyr
 210 215 220

Thr Asn Leu Asn Arg Leu Ile Gly Gln Ile Val Ser Ser Ile Thr Ala
 225 230 235 240

Ser Leu Arg Phe Asp Gly Ala Leu Asn Val Asp Leu Thr Glu Phe Gln
 245 250 255

Thr Asn Leu Val Pro Tyr Pro Arg Ile His Phe Pro Leu Ala Thr Tyr
 260 265 270

Ala Pro Val Ile Ser Ala Glu Lys Ala Tyr His Glu Gln Leu Ser Val
 275 280 285

Ala Glu Ile Thr Asn Ala Cys Phe Glu Pro Ala Asn Gln Met Val Lys
 290 295 300

Cys Asp Pro Arg His Gly Lys Tyr Met Ala Cys Cys Met Leu Tyr Arg
 305 310 315 320

Gly Asp Val Val Pro Lys Asp Val Asn Ala Ala Ile Ala Thr Ile Lys
 325 330 335

Thr Lys Arg Thr Ile Gln Phe Val Asp Trp Cys Pro Thr Gly Phe Lys
 340 345 350

Val Gly Ile Asn Tyr Gln Pro Pro Thr Val Val Pro Gly Gly Asp Leu
 355 360 365

Ala Lys Val Gln Arg Ala Val Cys Met Leu Ser Asn Thr Thr Ala Ile
 370 375 380

Ala Glu Ala Trp Ala Arg Leu Asp His Lys Phe Asp Leu Met Tyr Ala
 385 390 395 400

Lys Arg Ala Phe Val His Trp Tyr Val Gly Glu Gly Met Glu Glu Gly
 405 410 415

Glu Phe Ser Glu Ala Arg Glu Asp Leu Ala Ala Leu Glu Lys Asp Tyr
 420 425 430

Glu Glu Val Gly Val Asp Ser Val Glu Ala Glu Ala Glu Glu Gly Glu
 435 440 445

Glu Tyr
 450

<210> 3

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 3

ES 2 621 413 T3

Met Arg Glu Cys Ile Ser Val His Val Gly Gln Ala Gly Val Gln Met
1 5 10 15

Gly Asn Ala Cys Trp Glu Leu Tyr Cys Leu Glu His Gly Ile Gln Pro
20 25 30

Asp Gly Gln Met Pro Ser Asp Lys Thr Ile Gly Gly Gly Asp Asp Ser
35 40 45

Phe Thr Thr Phe Phe Cys Glu Thr Gly Ala Gly Lys His Val Pro Arg
50 55 60

Ala Val Phe Val Asp Leu Glu Pro Thr Val Ile Asp Glu Ile Arg Asn
65 70 75 80

Gly Pro Tyr Arg Gln Leu Phe His Pro Glu Gln Leu Ile Thr Gly Lys
85 90 95

Glu Asp Ala Ala Asn Asn Tyr Ala Arg Gly His Tyr Thr Ile Gly Lys
100 105 110

Glu Ile Ile Asp Pro Val Leu Asp Arg Ile Arg Lys Leu Ser Asp Gln
115 120 125

Cys Thr Gly Leu Gln Gly Phe Leu Val Phe His Ser Phe Gly Gly Gly
130 135 140

Thr Gly Ser Gly Phe Thr Ser Leu Leu Met Glu Arg Leu Ser Val Asp
145 150 155 160

Tyr Gly Lys Lys Ser Lys Leu Glu Phe Ser Ile Tyr Pro Ala Pro Gln
165 170 175

Val Ser Thr Ala Val Val Glu Pro Tyr Asn Ser Ile Leu Thr Thr His
180 185 190

Thr Thr Leu Glu His Ser Asp Cys Ala Phe Met Val Asp Asn Glu Ala
195 200 205

ES 2 621 413 T3

Ile Tyr Asp Ile Cys Arg Arg Asn Leu Asp Ile Glu Arg Pro Thr Tyr
 210 215 220

Thr Asn Leu Asn Arg Leu Ile Ser Gln Ile Val Ser Ser Ile Thr Ala
 225 230 235 240

Ser Leu Arg Phe Asp Gly Ala Leu Asn Val Asp Leu Thr Glu Phe Gln
 245 250 255

Thr Asn Leu Val Pro Tyr Pro Arg Ile His Phe Pro Leu Ala Thr Tyr
 260 265 270

Ala Pro Val Ile Ser Ala Glu Lys Ala Tyr His Glu Gln Leu Ser Val
 275 280 285

Ala Glu Ile Thr Asn Ala Cys Phe Glu Pro Ala Asn Gln Met Val Lys
 290 295 300

Cys Asp Pro Arg His Gly Lys Tyr Met Ala Cys Cys Leu Leu Tyr Arg
 305 310 315 320

Gly Asp Val Val Pro Lys Asp Val Asn Ala Ala Ile Ala Ala Ile Lys
 325 330 335

Thr Lys Arg Ser Ile Gln Phe Val Asp Trp Cys Pro Thr Gly Phe Lys
 340 345 350

Val Gly Ile Asn Tyr Gln Pro Pro Thr Val Val Pro Gly Gly Asp Leu
 355 360 365

Ala Lys Val Gln Arg Ala Val Cys Met Leu Ser Asn Thr Thr Ala Ile
 370 375 380

Ala Glu Ala Trp Ala Arg Leu Asp His Lys Phe Asp Leu Met Tyr Ala
 385 390 395 400

Lys Arg Ala Phe Val His Trp Tyr Val Gly Glu Gly Met Glu Glu Gly
 405 410 415

Glu Phe Ser Glu Ala Arg Glu Asp Met Ala Ala Leu Glu Lys Asp Tyr
 420 425 430

Glu Glu Val Gly Ile Asp Ser Tyr Glu Asp Glu Asp Glu Gly Glu Glu
 435 440 445

<210> 4

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 621 413 T3

Met Arg Glu Cys Ile Ser Val His Val Gly Gln Ala Gly Val Gln Ile
 1 5 10 15

Gly Asn Ala Cys Trp Glu Leu Phe Cys Leu Glu His Gly Ile Gln Ala
 20 25 30

Asp Gly Thr Phe Asp Ala Gln Ala Ser Lys Ile Asn Asp Asp Asp Ser
 35 40 45

Phe Thr Thr Phe Phe Ser Glu Thr Gly Asn Gly Lys His Val Pro Arg
 50 55 60

Ala Val Met Ile Asp Leu Glu Pro Thr Val Val Asp Glu Val Arg Ala
 65 70 75 80

Gly Thr Tyr Arg Gln Leu Phe His Pro Glu Gln Leu Ile Thr Gly Lys
 85 90 95

Glu Asp Ala Ala Asn Asn Tyr Ala Arg Gly His Tyr Thr Val Gly Lys
 100 105 110

Glu Ser Ile Asp Leu Val Leu Asp Arg Ile Arg Lys Leu Thr Asp Ala
 115 120 125

Cys Ser Gly Leu Gln Gly Phe Leu Ile Phe His Ser Phe Gly Gly Gly
 130 135 140

Thr Gly Ser Gly Phe Thr Ser Leu Leu Met Glu Arg Leu Ser Leu Asp
 145 150 155 160

Tyr Gly Lys Lys Ser Lys Leu Glu Phe Ala Ile Tyr Pro Ala Pro Gln
 165 170 175

Val Ser Thr Ala Val Val Glu Pro Tyr Asn Ser Ile Leu Thr Thr His
 180 185 190

Thr Thr Leu Glu His Ser Asp Cys Ala Phe Met Val Asp Asn Glu Ala
 195 200 205

Ile Tyr Asp Ile Cys Arg Arg Asn Leu Asp Ile Glu Arg Pro Thr Tyr
 210 215 220

Thr Asn Leu Asn Arg Leu Ile Ser Gln Ile Val Ser Ser Ile Thr Ala

ES 2 621 413 T3

225						230										235															240
Ser	Leu	Arg	Phe	Asp	Gly	Ala	Leu	Asn	Val	Asp	Leu	Thr	Glu	Phe	Gln																
				245					250					255																	
Thr	Asn	Leu	Val	Pro	Tyr	Pro	Arg	Ile	His	Phe	Pro	Leu	Val	Thr	Tyr																
			260					265					270																		
Ala	Pro	Ile	Ile	Ser	Ala	Glu	Lys	Ala	Tyr	His	Glu	Gln	Leu	Ser	Val																
		275					280					285																			
Ala	Glu	Ile	Thr	Ser	Ser	Cys	Phe	Glu	Pro	Asn	Ser	Gln	Met	Val	Lys																
	290					295					300																				
Cys	Asp	Pro	Arg	His	Gly	Lys	Tyr	Met	Ala	Cys	Cys	Met	Leu	Tyr	Arg																
305					310					315					320																
Gly	Asp	Val	Val	Pro	Lys	Asp	Val	Asn	Val	Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Lys																
				325				330						335																	
Thr	Lys	Arg	Thr	Ile	Gln	Phe	Val	Asp	Trp	Cys	Pro	Thr	Gly	Phe	Lys																
			340					345					350																		
Val	Gly	Ile	Asn	Tyr	Gln	Pro	Pro	Thr	Val	Val	Pro	Gly	Gly	Asp	Leu																
		355					360					365																			
Ala	Lys	Val	Gln	Arg	Ala	Val	Cys	Met	Leu	Ser	Asn	Thr	Thr	Ala	Ile																
	370					375					380																				
Ala	Glu	Ala	Trp	Ala	Arg	Leu	Asp	His	Lys	Phe	Asp	Leu	Met	Tyr	Ala																
385					390					395				400																	
Lys	Arg	Ala	Phe	Val	His	Trp	Tyr	Val	Gly	Glu	Gly	Met	Glu	Glu	Gly																
				405					410				415																		
Glu	Phe	Ser	Glu	Ala	Arg	Glu	Asp	Leu	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Asp	Tyr																
			420				425					430																			
Glu	Glu	Val	Gly	Thr	Asp	Ser	Phe	Glu	Glu	Glu	Asn	Glu	Gly	Glu	Glu																
		435				440						445																			
Phe																															

<210> 5
<211> 444
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 621 413 T3

<400> 5

Met Arg Glu Ile Val His Ile Gln Ala Gly Gln Cys Gly Asn Gln Ile
 1 5 10 15

Gly Ala Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp Glu His Gly Ile Asp Pro
 20 25 30

Thr Gly Thr Tyr His Gly Asp Ser Asp Leu Gln Leu Asp Arg Ile Ser
 35 40 45

Val Tyr Tyr Asn Glu Ala Thr Gly Gly Lys Tyr Val Pro Arg Ala Ile
 50 55 60

Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp Ser Val Arg Ser Gly Pro
 65 70 75 80

Phe Gly Gln Ile Phe Arg Pro Asp Asn Phe Val Phe Gly Gln Ser Gly
 85 90 95

Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr Thr Glu Gly Ala Glu Leu
 100 105 110

Val Asp Ser Val Leu Asp Val Val Arg Lys Glu Ala Glu Ser Cys Asp
 115 120 125

Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser Leu Gly Gly Gly Thr Gly
 130 135 140

Ser Gly Met Gly Thr Leu Leu Ile Ser Lys Ile Arg Glu Glu Tyr Pro
 145 150 155 160

Asp Arg Ile Met Asn Thr Phe Ser Val Val Pro Ser Pro Lys Val Ser
 165 170 175

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

Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Tyr Cys Ile Asp Asn Glu Ala Leu Tyr
 195 200 205

Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu Lys Leu Thr Thr Pro Thr Tyr Gly Asp
 210 215 220

Leu Asn His Leu Val Ser Ala Thr Met Ser Gly Val Thr Thr Cys Leu
 225 230 235 240

ES 2 621 413 T3

Arg Phe Pro Gly Gln Leu Asn Ala Asp Leu Arg Lys Leu Ala Val Asn
 245 250 255

Met Val Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe Met Pro Gly Phe Ala Pro
 260 265 270

Leu Thr Ser Arg Gly Ser Gln Gln Tyr Arg Ala Leu Thr Val Pro Glu
 275 280 285

Leu Thr Gln Gln Val Phe Asp Ala Lys Asn Met Met Ala Ala Cys Asp
 290 295 300

Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu Thr Val Ala Ala Val Phe Arg Gly Arg
 305 310 315 320

Met Ser Met Lys Glu Val Asp Glu Gln Met Leu Asn Val Gln Asn Lys
 325 330 335

Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro Asn Asn Val Lys Thr Ala
 340 345 350

Val Cys Asp Ile Pro Pro Arg Gly Leu Lys Met Ala Val Thr Phe Ile
 355 360 365

Gly Asn Ser Thr Ala Ile Gln Glu Leu Phe Lys Arg Ile Ser Glu Gln
 370 375 380

Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe Leu His Trp Tyr Thr Gly
 385 390 395 400

Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu Ala Glu Ser Asn Met Asn
 405 410 415

Asp Leu Val Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln Asp Ala Thr Ala Glu Glu
 420 425 430

Glu Glu Asp Phe Gly Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala
 435 440

<210> 6
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Arg Glu Ile Val His Ile Gln Ala Gly Gln Cys Gly Asn Gln Ile
 1 5 10 15

ES 2 621 413 T3

Gly Ala Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp Glu His Gly Ile Asp Pro
 20 25 30

Ser Gly Asn Tyr Val Gly Asp Ser Asp Leu Gln Leu Glu Arg Ile Ser
 35 40 45

Val Tyr Tyr Asn Glu Ala Ser Ser His Lys Tyr Val Pro Arg Ala Ile
 50 55 60

Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp Ser Val Arg Ser Gly Ala
 65 70 75 80

Phe Gly His Leu Phe Arg Pro Asp Asn Phe Ile Phe Gly Gln Ser Gly
 85 90 95

Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr Thr Glu Gly Ala Glu Leu
 100 105 110

Val Asp Ser Val Leu Asp Val Val Arg Lys Glu Cys Glu Asn Cys Asp
 115 120 125

Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser Leu Gly Gly Gly Thr Gly
 130 135 140

Ser Gly Met Gly Thr Leu Leu Ile Ser Lys Val Arg Glu Glu Tyr Pro
 145 150 155 160

Asp Arg Ile Met Asn Thr Phe Ser Val Val Pro Ser Pro Lys Val Ser
 165 170 175

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

Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Tyr Cys Ile Asp Asn Glu Ala Leu Tyr
 195 200 205

Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu Lys Leu Ala Thr Pro Thr Tyr Gly Asp
 210 215 220

Leu Asn His Leu Val Ser Ala Thr Met Ser Gly Val Thr Thr Ser Leu
 225 230 235 240

Arg Phe Pro Gly Gln Leu Asn Ala Asp Leu Arg Lys Leu Ala Val Asn
 245 250 255

Met Val Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe Met Pro Gly Phe Ala Pro
 260 265 270

ES 2 621 413 T3

Leu Thr Ala Arg Gly Ser Gln Gln Tyr Arg Ala Leu Thr Val Pro Glu
 275 280 285

Leu Thr Gln Gln Met Phe Asp Ala Lys Asn Met Met Ala Ala Cys Asp
 290 295 300

Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu Thr Val Ala Thr Val Phe Arg Gly Arg
 305 310 315 320

Met Ser Met Lys Glu Val Asp Glu Gln Met Leu Ala Ile Gln Ser Lys
 325 330 335

Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro Asn Asn Val Lys Val Ala
 340 345 350

Val Cys Asp Ile Pro Pro Arg Gly Leu Lys Met Ser Ser Thr Phe Ile
 355 360 365

Gly Asn Ser Thr Ala Ile Gln Glu Leu Phe Lys Arg Ile Ser Glu Gln
 370 375 380

Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe Leu His Trp Tyr Thr Gly
 385 390 395 400

Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu Ala Glu Ser Asn Met Asn
 405 410 415

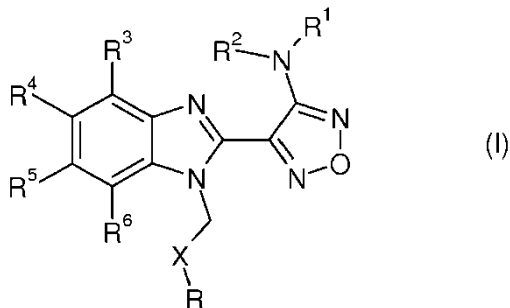
Asp Leu Val Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln Asp Ala Thr Ala Glu Glu
 420 425 430

Glu Gly Glu Met Tyr Glu Asp Asp Glu Glu Glu Ser Glu Ala Gln Gly
 435 440 445

Pro Lys
 450

REIVINDICACIONES

1. Uso de tubulina acetilada 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, hidroxil-alquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxil, alcoxi inferior, hidroxil-alcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenil-alcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman, junto con el nitrógeno, heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son 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 hidroxil o alcoxi inferior;

15 R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxil-alquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

o R⁴ y R⁵ juntos representan metilendioxo;

20 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,

25 en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxil-alquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxil, alcoxi inferior, hidroxil-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 metilendioxo;

30

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

X representa oxígeno;

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxil-alquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

35 R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

o R⁴ y R⁵ 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,

5 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 tubulina acetilada se mide *ex vivo* en una muestra o muestras tomadas del cuerpo humano o animal, preferiblemente tomadas del cuerpo humano.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en el compuesto de fórmula general I,

R representa fenilo o piridinilo;

10 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;

X representa un grupo C=O;

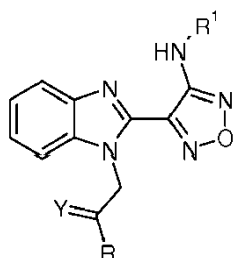
R¹ representa hidrógeno o ciano-alquilo inferior;

15 R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ 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 incluye un máximo de 4 átomos de carbono.

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

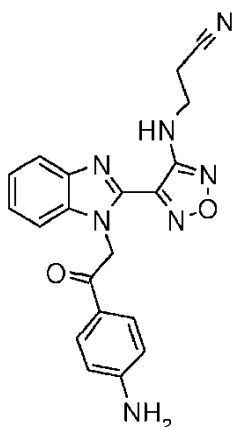


en donde R, Y y R¹ se definen como sigue:

R	Y	R1
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN

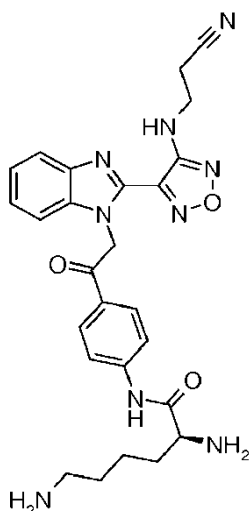
o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se definen en la reivindicación 1.

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, 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



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.
9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, 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, leucemia de células T y sarcomas.
11. 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 cervical, cáncer de ovario, leucemia de células T y cáncer de pulmón.
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, cáncer de ovario y leucemia de células T.

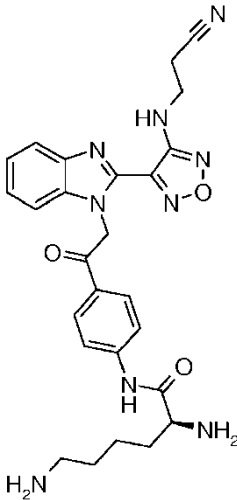
13. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde una concentración elevada de tubulina acetilada en la muestra del sujeto con relación a un valor estándar o conjunto de valores estándares o concentraciones de inicio de pre-tratamiento predice resistencia.
- 5 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde concentraciones más altas de tubulina acetilada 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
- 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
- 10 iii) con relación a un valor estándar o un conjunto de valores estándares a partir de células o tejidos normales;
- son predictivas de resistencia.
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.
- 15 16. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la muestra se deriva de tejido normal tejido tumoral 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:
- 20 a1) medir una concentración ex vivo de tubulina acetilada en una muestra pre-obtenida del tejido tumoral o células tumorales circulantes del sujeto que padece el cáncer para obtener un valor o valores que representan esta concentración; o
- 25 a2) medir una concentración ex vivo de tubulina acetilada en una muestra pre-obtenida del sujeto que padece el cáncer, después de iniciar el tratamiento con el compuesto de fórmula general I, para obtener un valor o valores que representan esta concentración;
- y
- 30 b1) comparar el valor o los valores de la etapa a1) con un valor estándar o un conjunto de valores estándares de los sujetos con el mismo tipo de cáncer, en donde una concentración de tubulina acetilada superior en la muestra del sujeto en relación con el valor estándar o el conjunto de valores estándares es predictiva de la resistencia; o
- 35 b2) comparar el valor o los valores de la etapa a2) con la concentración de inicio de pre-tratamiento de ese sujeto, en donde una concentración de tubulina acetilada superior en la muestra después de iniciar el tratamiento en relación con la concentración de inicio de pre-tratamiento predice la resistencia adquirida;
- y preferiblemente en donde el cáncer es un cáncer tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10, 11 ó 12.
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 tubulina acetilada, medida ex vivo en una muestra de un sujeto humano que no es mayor que un valor estándar o conjunto de valores estándares de sujetos con el mismo histotipo de tumor o de células, tejido o fluido corporal normales, en donde una concentración elevada de tubulina acetilada 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.
- 40 45
19. Un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 18, para uso en el tratamiento de un cáncer, preferiblemente un cáncer tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10, 11 ó 12.
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 tubulina acetilada 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
- 50

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;

5 y que comprende, además, un módulo de comparador que comprende un valor estándar o un conjunto de valores estándares de una concentración de tubulina acetilada 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 tubulina acetilada en la muestra, en donde una concentración elevada de tubulina acetilada 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).

10 21. El kit de acuerdo con la reivindicación 20, en donde los reactivos comprenden un reactivo de captura que comprende un detector para tubulina acetilada y un reactivo detector, preferiblemente, en donde el reactivo de captura es un anticuerpo.

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



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

Figura 1

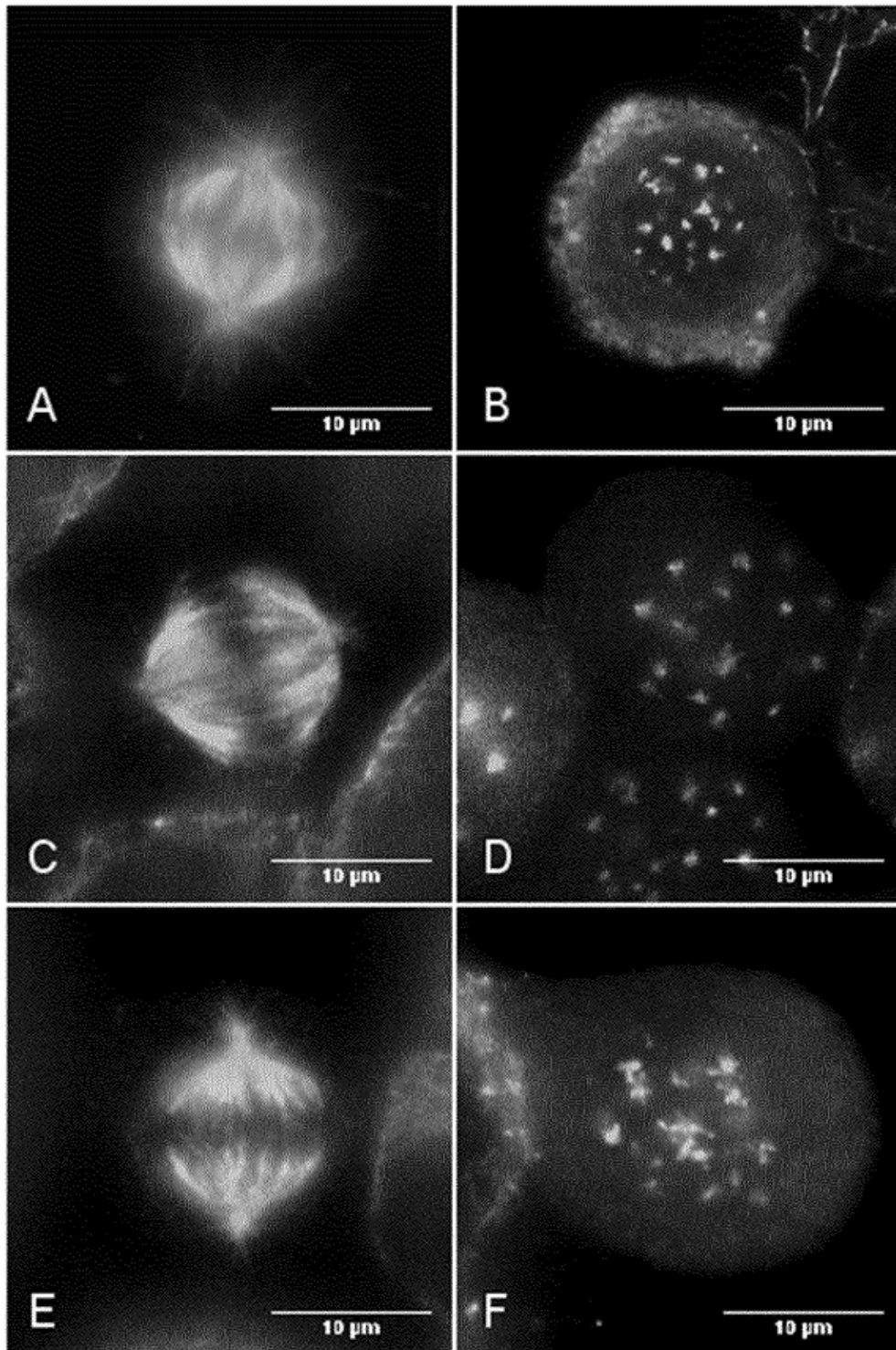


Figura 2

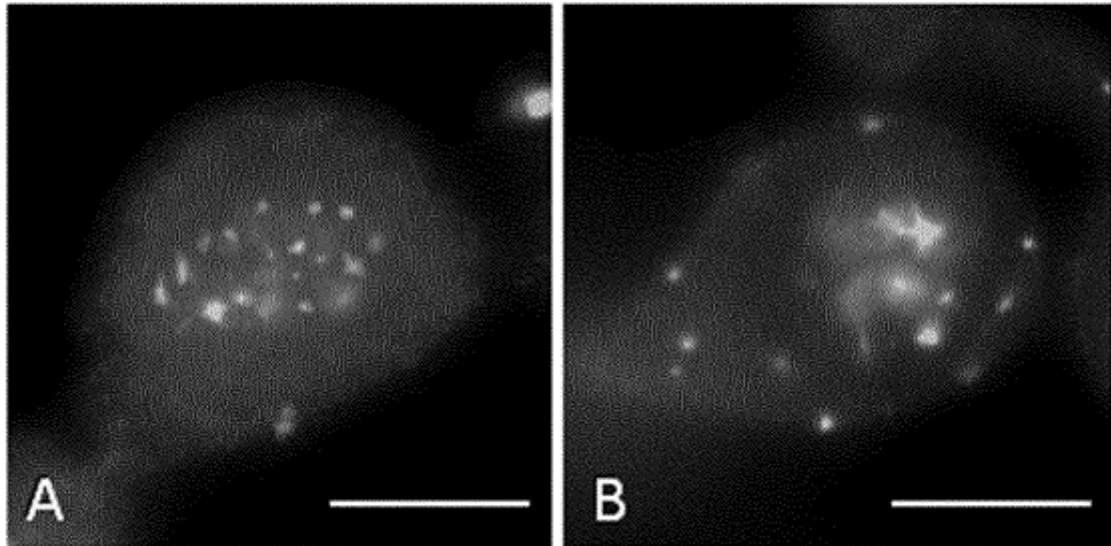


Figura 3

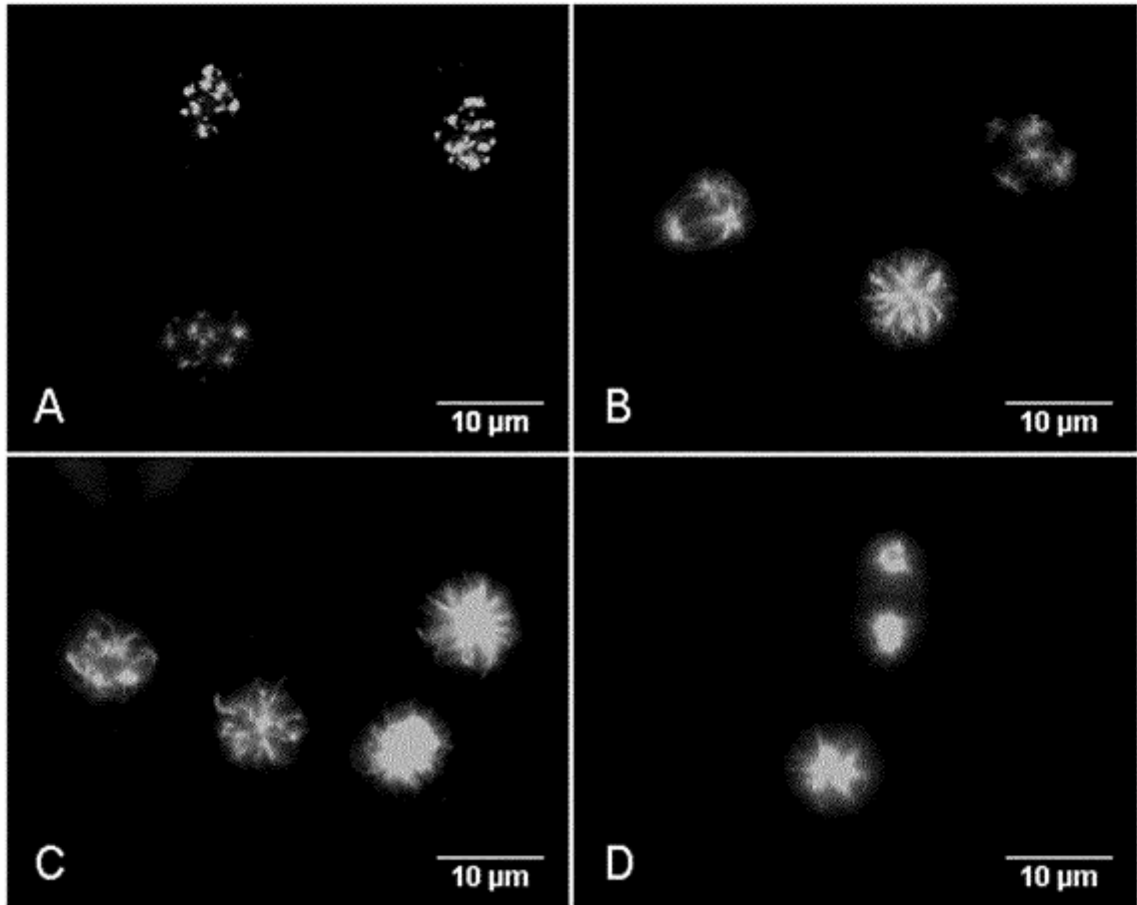


Figura 4

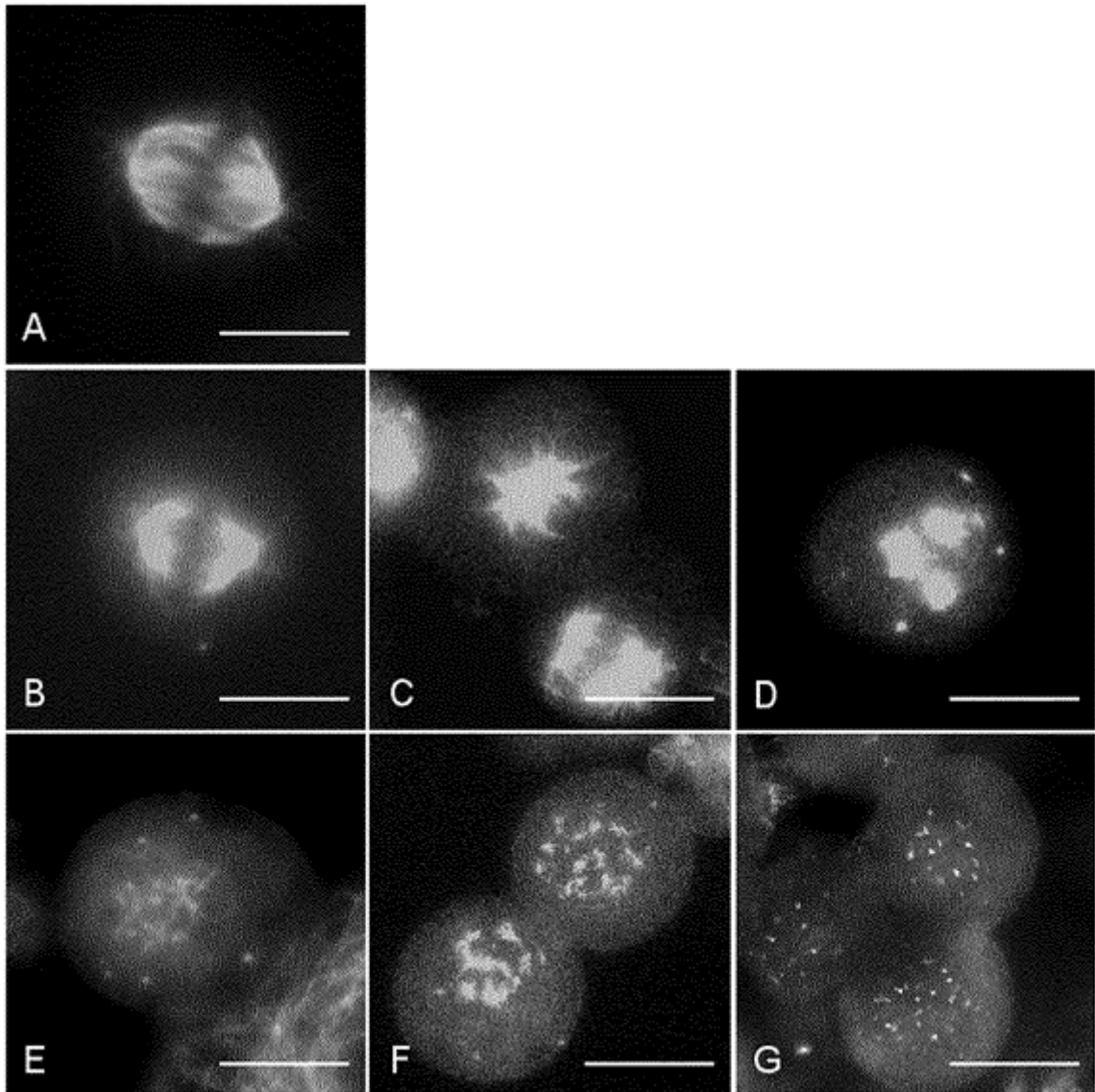


Figura 5

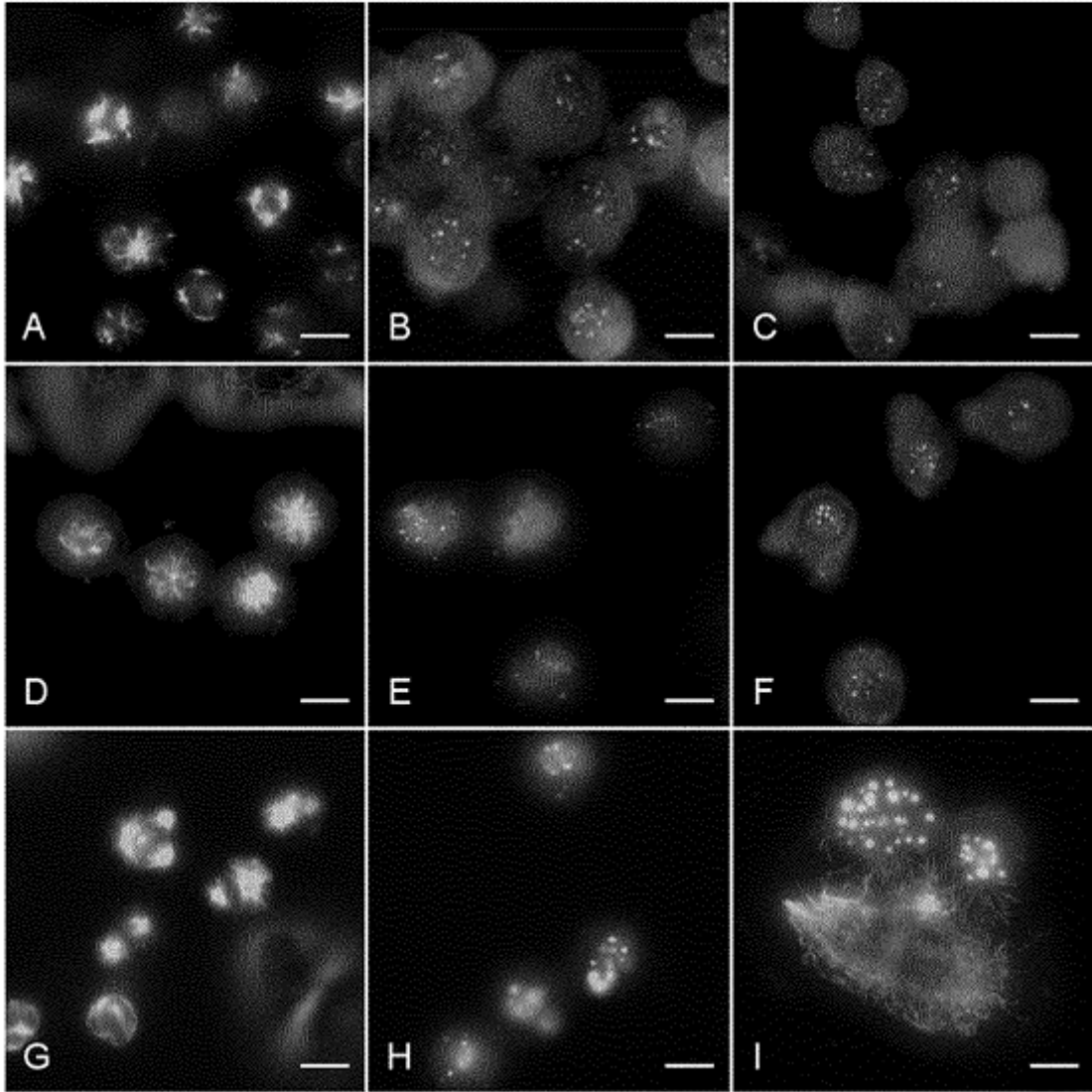


Figura 6

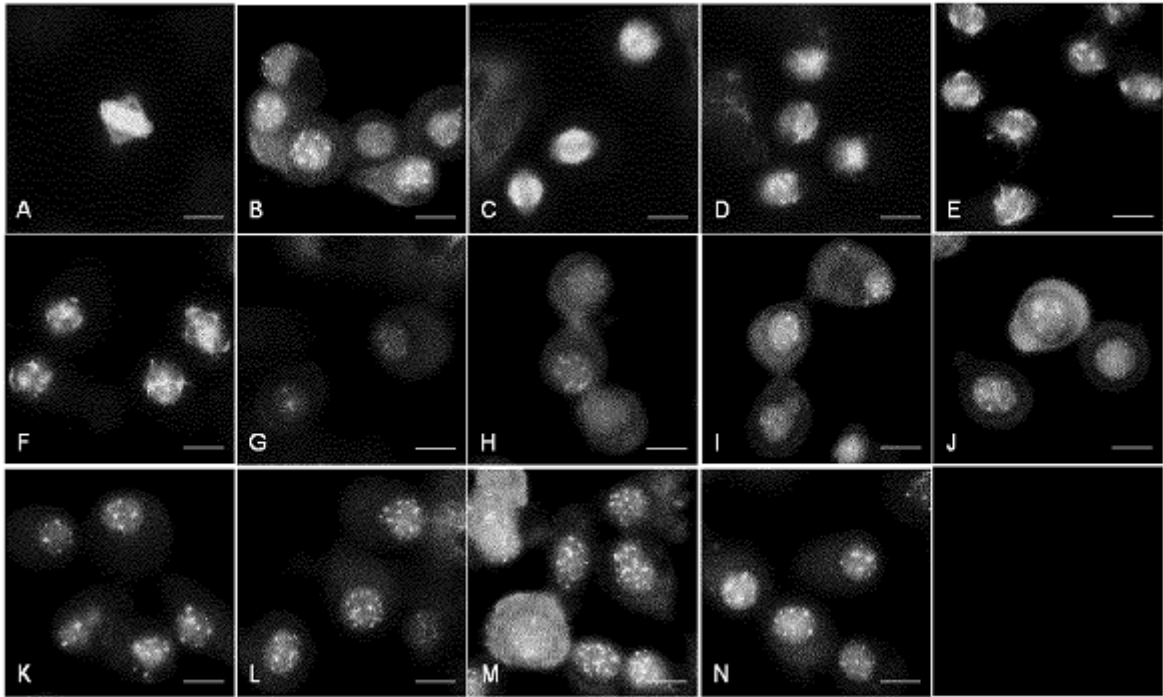


Figura 7

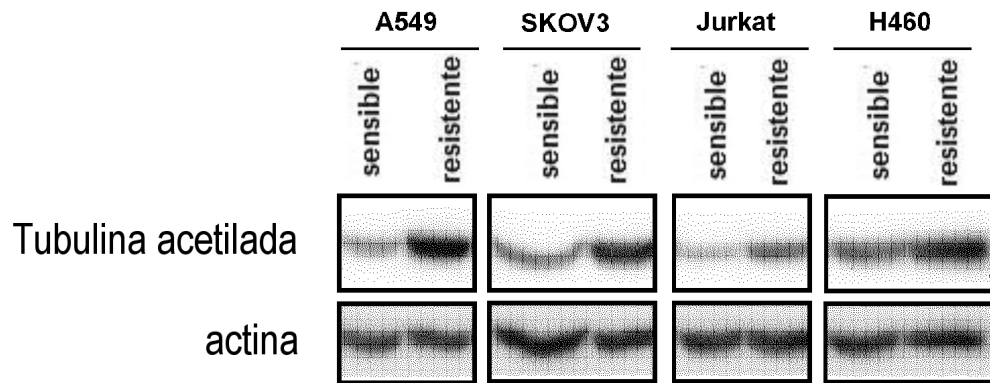


Figura 8

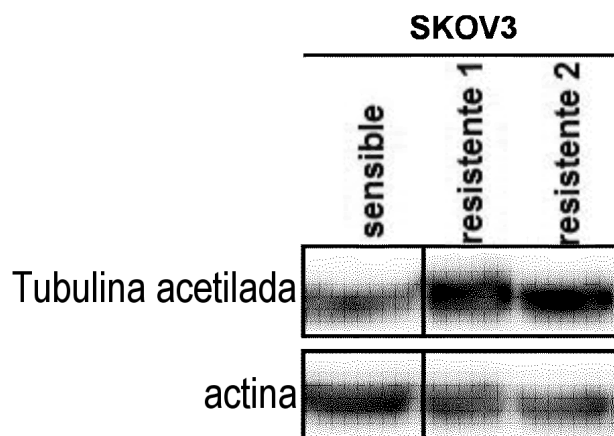


Figura 9

Cadena de tubulina alfa-1C [Homo sapiens] (SEQ. ID. NO. 1)

```

1 mrecisihvg qagvqignac welyclehgi qpdgqmpsdk tiggddsfntffsetgagk
61 hvpravfvdl eptvidevrt gtyrqlfhpe qlitgkedaannyarghyti gkeiidlvld
121 rirkladqct glqgflvfhs fgggtgsgft sllmerlsvd ygkksklefs iypapqvsta
181 vvepynsilt thttlehsdc afmvdneaiy dicrrnldie rptytnlnrl isqivssita
241 slrfdgalnv dltefqtnlv pyprihfpla tyapvisaek ayheqltvae itnacfevan
301 qmvkcdprhg kymaccllyr gdvvpkdvna aiatiktkrt iqfvdwcptg fkvginypqp
361 tvvpggdak vqravcmnsn ttavaeawar ldhkfdlmya krafvhwvyg egmeegefs
421 aredmaalek dyeevgadsa dgedegeey
    
```

Figura 10

Cadena de tubulina alfa-3C/D [Homo sapiens] (SEQ. ID. NO. 2)

```

1 mrecisihvg qagvqignac welyclehgi qpdgqmpsdk tiggddsfntffsetgagk
61 hvpravfvdl eptvdevrt gtyrqlfhpe qlitgkedaannyarghyti gkeivdlvld
121 rirkladlct glqgflifhs fgggtgsgfa sllmerlsvd ygkksklefa iypapqvsta
181 vvepynsilt thttlehsdc afmvdneaiy dicrrnldie rptytnlnrl igqivssita
241 slrfdgalnv dltefqtnlv pyprihfpla tyapvisaek ayheqlsvae itnacfevan
301 qmvkcdprhg kymaccmlyr gdvvpkdvna aiatiktkrt iqfvdwcptg fkvginypqp
361 tvvpggdak vqravcmnsn ttaiiaeawar ldhkfdlmya krafvhwvyg egmeegefs
421 aredlaalek dyeevgvdsv eaeaegeey
    
```

Figura 11

Cadena de tubulina alfa-4A [Homo sapiens] (SEQ. ID. NO. 3)

```

1 mrecisvhvg qagvqmgnac welyclehgi qpdgqmpsdk tiggddsfntffcetgagk
61 hvpravfvdl eptvideirn gpyrqlfhpe qlitgkedaannyarghyti gkeiidpvld
121 rirklsdqct glqgflvfhs fgggtgsgft sllmerlsvd ygkksklefs iypapqvsta
181 vvepynsilt thttlehsdc afmvdneaiy dicrrnldie rptytnlnrl isqivssita
241 slrfdgalnv dltefqtnlv pyprihfpla tyapvisaek ayheqlsvae itnacfevan
301 qmvkcdprhg kymaccllyr gdvvpkdvna aiaaiktks iqfvdwcptg fkvginypqp
361 tvvpggdak vqravcmnsn ttaiiaeawar ldhkfdlmya krafvhwvyg egmeegefs
421 aredmaalek dyeevgidsy ededegee
    
```

Figura 12

Isoforma 1 de la cadena de tubulina alfa-8 [Homo sapiens] (SEQ. ID. NO 4)

```

1 mrecisvhvg qagvqignac welcfehgi qadgtfdaqa skindddsft tffsetgngk
61 hvpravmidl eptvvdevra gtyrqflhpe qlitgkeda nnyarghytv gkesidlvld
121 rirklt dacs glqgf lifhs fgggtgsgft sllmerlsld ygkksklefa iypapqvsta
181 vvepynsilt thttlehsdc afmvdneaiy dicrrndie rptytnlnrl isqivssita
241 slrfdgalnv dltefqtnlv pyprihfplv tyapiisaek ayheqlsvae itsscfepons
301 qmvkcdprhg kymaccmlyr gdvvpkdvuv aiaaiktprt iqfvdwcpvg fkvginypqp
361 tvvpggdldk vqravcmlsn ttaiaeawar ldhkfdlmya krafvhwvyvg egmeegefsf
421 aredlaalek dyeevgt dsf eeenegeef

```

Figura 13

Cadena de tubulina beta [Homo sapiens] (SEQ. ID. NO 5)

```

1 mreivhiqag qcgnqigakf wevisdehgi dptgtyhgds dlqldrsvy yneatggkyv
61 prailvdlep gtmdsvrsgp fgqifrpdnf vfgqsgagnn wakghytega elvdsvldvv
121 rkeaescdcl qgfqlthslg ggtgsgmglt liskireeyp drimntfsvv pspkvsdtvv
181 epynatlsvh qlventdety cidnealydi cfrtlklttp tygdlnhlvs atmsgvttcl
241 rfpqqlnadl rklavnmvpf prlhffmpgf apltsrgsqq yraltvpelt qqvfdaknm
301 aacdprhgry ltvaavfrgr msmkevdeqm lnvqknssy fvewipnnvk tavcdipprg
361 lkmavtfign staiqelfkr iseqftamfr rkafllhwytg egmdemefte aesnmndlvs
421 eyqqyqdata eeeedfgeea eeee

```

Figura 14

Isoforma 1 de la cadena de tubulina beta-3 [Homo sapiens] (SEQ. ID. NO 6)

```

1 mreivhiqag qcgnqigakf wevisdehgi dpgsgnyvgs dlqlerisvy yneasshkyv
61 prailvdlep gtmdsvrsga fghlfrpdnf ifgqsgagnn wakghytega elvdsvldvv
121 rkecencdcl qgfqlthslg ggtgsgmglt liskvreeyp drimntfsvv pspkvsdtvv
181 epynatlsih qlventdety cidnealydi cfrtlklatp tygdlnhlvs atmsgvttsl
241 rfpqqlnadl rklavnmvpf prlhffmpgf apлтarqsqq yraltvpelt qqmfdaknm
301 aacdprhgry ltvatvfrgr msmkevdeqm laiqsknssy fvewipnnvk vavcdipprg
361 lkmsstfign staiqelfkr iseqftamfr rkafllhwytg egmdemefte aesnmndlvs
421 eyqqyqdata eeegemyedd eeeseaqgpk

```