

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 624 982**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2012 PCT/US2012/045864**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13009657**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012 E 12811358 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2729806**

(54) Título: Usos de inhibidores etiquetados HSP90

(30) Prioridad:

08.07.2011 US 201161506010 P

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

18.07.2017

(73) Titular/es:

SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH (50.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10065, US y
CORNELL UNIVERSITY (50.0%)

(72) Inventor/es:

CHIOSIS, GABRIELA;
TALDONE, TONY;
ALPAUGH, MARY, L.;
GOMES-DAGAMA, ERICA, M.;
GUZMAN, MONICA, L. y
ZONG, HONGLIANG

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 624 982 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

Usos de inhibidores etiquetados HSP90

Antecedentes de la invención

Para mantener la homeostasis, las células emplean mecanismos moleculares intrincados que comprenden miles de proteínas programadas para ejecutar funciones bien definidas. La desregulación de estas vías, a través de la mala expresión o mutación de las proteínas, puede realizar ventajas biológicas que confieren un fenotipo maligno. Aunque a nivel celular tal desregulación puede ser beneficiosa (*es decir* que favorece a la supervivencia incrementada), en el nivel molecular esta requiere células para invertir energía en el mantenimiento de la estabilidad y función de estas proteínas. Se cree que para mantener estas proteínas en un estado pseudoestable, las células cancerosas co-optan por chaperonas moleculares, incluyendo la HSP90^{32,33}.

En apoyo de esta hipótesis, la HSP90 es reconocida por desempeñar funciones importantes en el mantenimiento del fenotipo transformado^{32,33}. La HSP90 y sus cochaperonas asociadas ayudan en la corrección del plegamiento conformacional de las proteínas celulares, referidas colectivamente como “proteínas cliente”, muchas de las cuales son efectoras de las vías de transducción de señal que controlan el crecimiento celular, la diferenciación, la respuesta del daño de DNA, y supervivencia celular. La adicción de las células tumorales a las proteínas desreguladas (*es decir* a través de mutaciones, expresión aberrante, translocación celular inapropiada etc.) de esta manera puede ser críticamente dependiente de HSP90³³.

Los fundamentos de la terapia de HSP90 en varias formas de cánceres ahora están muy respaldados por estudios preclínicos y clínicos incluyendo en la resistencia de la enfermedad a la terapia estándar⁹¹⁻⁹⁷. Por ejemplo, los estudios han mostrado una sensibilidad notable de ciertos tumores HER2+ a los inhibidores de HSP90^{98,99}. En estos tumores, el 17-AAG (también llamado Tanespimicina) y 17-DMAG (Alvespimicina) indujeron respuestas aún, y en particular, en pacientes con enfermedad progresiva después de la terapia con trastuzumab⁹⁸. Otros inhibidores de HSP90, tal como PU-H71, cuando se sometieron a pruebas preclínicas en una variedad de modelos de ratón de cáncer de mama triple negativo, mostraron el efecto antitumoral de agente individual dirigido más potente jamás reportado en este subtipo de cáncer de mama difícil de tratar¹⁰⁰.

Aunque estos datos apoyan en gran medida el uso de inhibidores de HSP90 en el cáncer, por el momento no hay un consenso claro en cómo identificar a esos pacientes a beneficiarse más probablemente de la terapia de HSP90^{101,102}. Esto es especialmente problemático sabiendo que para un desarrollo exitoso del agente dirigido es esencial definir la subpoblación de pacientes que deben recibir el fármaco (*es decir*, tumores con mutaciones EGFR de Tarceva). Esta selección puede reducir el número de pacientes que reciben tratamiento ineficaz y disminuyen el asombroso número de agentes de oncología dirigidos que fracasan en los ensayos clínicos de etapa final.

Además, no existe ensayo clínico que pueda verificar no invasivamente la inhibición de la HSP90 objetivo. Aunque la supervisión farmacodinámica de los linfocitos de sangre periférica ha proporcionado un índice fácilmente accesible y reproducible de actividad biológica *in vivo* de los inhibidores de HSP90 en ensayos clínicos, los efectos del fármaco en el tejido normal no predicen la actividad específica de tumor^{97,101,102}. El uso prudente de biopsias para medir los cambios farmacodinámicos ha seguido siendo una forma importante para someter a prueba la modulación objetivo, pero este método sigue siendo limitado debido a los problemas logísticos y éticos asociados con los ensayos invasivos. Como una alternativa, los cambios en los niveles de HER2 y VEGF tumorales ahora están siendo investigados usando anticuerpos etiquetados con zirconio 89^{103,104} y de los niveles de dominio extracelular HER2 solubles en sueros de pacientes por ELISA¹⁰⁵, pero estos estudios se restringen al subconjunto de tumores de mama que expresan estos biomarcadores. Los métodos para evaluar la respuesta de una célula cancerosa a un tratamiento mediante un inhibidor de HSP90 también se describen en la solicitud de patente internacional WO 2010/020618 y en la solicitud de patente de EE. UU. 2011/118298A1.

Por consiguiente, existe una fuerte necesidad de biomarcadores en la terapia dirigida hacia HSP90: La mayoría de pacientes con cáncer se tratan con terapias experimentales, novedosas, en muchos casos con poca información sobre el mecanismo de acción del agente específico, la idoneidad de un tratamiento particular para diferentes subconjuntos de enfermedades, y poco conocimiento sobre la dosis óptima y programa de agentes terapéuticos en diferentes entornos malignos. El resultado final es la investigación clínica empírica, en la cual los pacientes con malignidades refractarias se tratan con un espectro de agentes novedosos sin conocimiento de cuáles procedimientos terapéuticos son mejores para diferentes contextos clínicos.

La HSP90 es un objetivo muy buscado en el cáncer debido a su función crítica en la estabilización y plegamiento de proteínas implicadas en la transformación oncocénica. Dado su potencial para degradar una variedad de diferentes oncoproteínas y afectar múltiples vías de señalización, se ha planteado la hipótesis de que los inhibidores de HSP90 (HSP90i) son activos en una amplia variedad de cánceres. Los ensayos clínicos iniciales han confirmado que potencial terapéutico de este procedimiento en un subconjunto de tumores, pero el descubrimiento de biomarcadores para predecir qué cánceres y poblaciones de pacientes serán los más sensibles a tal tratamiento ha resultado un problema. Tal entendimiento deficiente y la selección de la población de pacientes adecuada han conducido a una gran variedad de agentes terapéuticos emergentes contra la HSP90 cancerosa que progresan

lentamente o no continúan con el desarrollo. Los esfuerzos inmediatos para identificar la población sensible y para desarrollar un ensayo de diagnóstico de acompañamiento para la terapia de HSP90 por lo tanto son urgentemente necesarios.

5 El diseño de una dosis y programa apropiados necesarios para lograr la eficacia antitumoral también es deficiente entendido en la terapia de HSP90. La farmacocinética del plasma proporciona generalmente datos informativos para el diseño de la dosificación terapéutica, con el área bajo la curva (AUC) de plasma frecuentemente como una medida de exposición sistémica del fármaco. Sin embargo, para los inhibidores de HSP90, la concentración y duración de la retención de los fármacos en los tejidos tumorales, y no en la sangre, determina su efecto antitumoral¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. Específicamente, la mayoría de inhibidores de HSP90 se caracterizan por un perfil farmacocinético atípico de eliminación rápida del plasma y tejidos normales pero retención de fármaco relativamente prolongada en los tumores (es decir durante 12-48 horas posterior a la administración). Como tal, el entendimiento clínico de la respuesta tumoral a la terapia de HSP90 sigue siendo severamente limitada si la respuesta se correlaciona con la dosis inyectada, en lugar de con la dosis tumoral. El valor limitado de la farmacocinética del plasma y la importancia de la dosis tumoral para la respuesta tumoral sugiere la necesidad del desarrollo clínico de un ensayo de farmacocinética del tumor para inhibidores de HSP90. Un ensayo no invasivo clínicamente práctico, validado de la HSP90 tumoral permitiría que la dosificación terapéutica se enfoque en lograr una concentración de fármaco tumoral de estado permanente, en lugar de una concentración en plasma de estado permanente sustituta. Tal ensayo podría indicar si en o por debajo de una dosificación permitida máxima, las concentraciones tumorales terapéuticamente efectivas se podrían lograr. En caso contrario, los pacientes podrían seguir un tratamiento alternativo evitándoles exposición innecesaria a la toxicidad del fármaco potencial sin un beneficio clínico.

10

15

20

Para superar estas limitaciones asociadas con la terapia de HSP90, los inventores diseñan y desarrollan en este documento un ensayo no invasivo que proponen facilitará la implementación clínica óptima, el desarrollo y uso de inhibidores de HSP90 en cánceres.

Sumario de la invención

25 Esta invención proporciona métodos para usar inhibidores de HSP90 etiquetados tal como se define en las reivindicaciones, para determinar si es probable que un paciente con un cáncer hematológico responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90.

30 La descripción proporciona evidencia de que la abundancia de esta especie "HSP90 oncogénica" particular, que no está dictada por la expresión de HSP90 sola, predice la sensibilidad a la terapia de inhibición de HSP90, y de esta manera es un biomarcador para la terapia de HSP90. La descripción también proporciona evidencia de que identificar y medir la abundancia de esta especie HSP90 oncogénica en tumores predice la respuesta a la terapia de HSP90. "HSP90 oncogénica" se define en la presente como la fracción HSP90 que representa una forma específica de tensión celular del complejo de chaperona, que se expande y mantiene constitutivamente en el contexto celular del tumor, y que puede ejecutar funciones necesarias para mantener el fenotipo maligno. Tales labores no sólo regulan el plegado de proteínas sobreexpresadas (esto es HER2), mutadas (esto es mB-Raf) o quiméricas (esto es Bcr-Abl), sino también facilitan la formación en complejo y andamiaje de moléculas involucradas en complejos de señalización aberrantemente activados (esto es STAT5, BCL6). Aunque el tumor se vuelve adicto a sobrevivir en una red de oncoproteínas HSP90, estas proteínas se vuelven dependientes de "HSP90 oncogénica" para su funcionamiento y estabilidad. Esta interdependencia simbiótica sugiere que la adicción de tumores a oncoproteínas HSP90 iguala la adicción a "HSP90 oncogénica". La medición de la abundancia de la última es una lectura de la primera, y por lo tanto, de acuerdo con la presente descripción, es un biomarcador para enriquecimiento de la terapia de HSP90.

35

40

45 Adicionalmente, se ha mostrado que HSP90 forma complejos bioquímicamente distintos en células malignas. Una fracción principal de HSP90 de célula cancerosa conserva las funciones de chaperona "constitutiva" similares a las células normales, mientras que un grupo HSP90 funcionalmente distinto enriquecido o expandido en células cancerosas (esto es, "HSP90 oncogénica") específicamente interactúa con proteínas oncogénicas requeridas para mantener la sobrevivencia de la célula tumoral, las características proliferativas aberrantes y el comportamiento invasivo y metastásico.

50 Para medir en una manera tumor por tumor la abundancia del "HSP90 oncogénica", la invención también proporciona herramientas químicas. Tales herramientas incluyen inhibidores de HSP90 etiquetados con ANCA y fluorescentemente etiquetados, inhibidores de HSP90 biotinilados e inhibidores radioetiquetados que específicamente se identifican e interactúan con esta especie de "HSP90 oncogénica" del tumor, haciendo esto posible medir la abundancia de la especie "HSP90 oncogénica" en diferentes tipos de tumores, células tumorales, células que soportan el tumor y formaciones biológicas asociadas con el tumor, tales como en malignidades hepáticas, tumores sólidos y tumores líquidos, y de esta manera, medir y predecir la sensibilidad para la terapia de inhibición de HSP90. Esto puede estar en la forma de, pero no limitado a, células cancerosas en un tumor sólido o líquido, células madre de cáncer, células tumorales circulantes, células inmunitarias que soportan el tumor, exosomas y células progenitoras que soportan el tumor.

55

Por lo tanto, la invención se refiere a un método para determinar si es probable que un paciente con cáncer en la

sangre responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende:

- (a) poner en contacto una muestra que contiene células cancerosas y células no cancerosas del paciente con un PU-H71 fluorescentemente etiquetado permeable a las células que se enlaza preferentemente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en las células cancerosas del paciente;
- 5 (b) medir la cantidad de PU-H71 enlazado a las células cancerosas y no cancerosas en la muestra; y
- (c) comparar la cantidad de PU-H71 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas con la cantidad de PU-H71 fluorescentemente marcado enlazado a las células no cancerosas,

donde una mayor cantidad de PU-H71 fluorescentemente marcado enlazado a las células cancerosas que a las células no cancerosas indica que probablemente el tumor responderá a un inhibidor de HSP90, preferiblemente donde las células no cancerosas son linfocitos y más preferiblemente, donde dicha medición se lleva a cabo mediante citometría de flujo.

Posteriormente se describirán otros aspectos de la descripción.

En un aspecto, la descripción proporciona un método para determinar si un tumor probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

- 15 (a) poner en contacto el tumor o una muestra que contiene células del tumor con un inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado que se enlaza preferencialmente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en un tumor o células tumorales;
- (b) medir la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado al tumor o a las células tumorales en la muestra; y
- 20 (c) comparar la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado al tumor o a las células tumorales en la muestra medida en la etapa (b) con la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado a una referencia;

en donde una cantidad mayor de inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado al tumor o a las células tumorales medidas en la etapa (b) como se compara con la cantidad de referencia indica que el tumor probablemente responderá al inhibidor de HSP90.

En una modalidad la referencia es de células del mismo paciente con el tumor. La referencia puede ser células normales del paciente con cáncer. Por ejemplo, las células normales pueden ser linfocitos de un paciente con un tumor en la sangre, leucocitos de un paciente con células tumorales circulantes o tejido normal que rodea un tumor sólido. En otra modalidad la referencia es una célula tumoral u otra célula del paciente con cáncer con poca hasta ninguna expresión del HSP90 oncogénica. En otra modalidad, la referencia es de células de un paciente diferente del paciente con el tumor. Por ejemplo, la referencia puede ser de células de un individuo saludable o células con poca hasta ninguna expresión del HSP90 oncogénica de un paciente con cáncer diferente del paciente con el tumor para medirse.

En un aspecto, la descripción proporciona un método para determinar si un tumor probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

- (a) poner en contacto el tumor o una muestra que contiene células del tumor con un primer inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado que se enlaza preferencialmente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en un tumor o células tumorales y un segundo inhibidor detectablemente etiquetado que tiene un enlace mínimo o ningún enlace a la forma específica del tumor de HSP90;
- 40 (b) medir la cantidad del primer inhibidor etiquetado y segundo inhibidor etiquetado enlazado al tumor o las células tumorales en la muestra; y
- (c) comparar la cantidad del primer inhibidor etiquetado enlazado al tumor o las células tumorales con la cantidad del segundo inhibidor etiquetado enlazado al tumor o células tumorales,

en donde una cantidad mayor del primer inhibidor etiquetado enlazado al tumor o células tumorales como se compara con el segundo inhibidor etiquetado enlazado al tumor o células tumorales indica que el tumor probablemente responderá al inhibidor de HSP90.

En una modalidad, el inhibidor de HSP90 etiquetado es un inhibidor etiquetado con ANCA o etiquetado fluorescentemente que es permeable a las células y que selectivamente se enlaza a "HSP90 oncogénica". Por ejemplo, se proporcionan diferentes versiones etiquetadas con ANCA o etiquetadas fluorescentemente del inhibidor de HSP90 PU-H71 que se han optimizado para uso en citometría de flujo y para los análisis de células cancerosas encontradas en o aisladas de un tumor líquido o sólido, células madre de cáncer, células tumorales circulantes, células inmunitarias que soportan el tumor, exosomas y células progenitoras que soportan el tumor, y para uso en la

tinción del tejido para muestras obtenidas por diversos métodos intervencionales tales como biopsias, cirugías y aspirados con aguja fina.

En tal modalidad, mostramos que los inhibidores etiquetados fluorescentemente tales como PU-H71-FITC2 (Sección 5.2.1.1.) pueden usarse para medir la abundancia de "HSP90 oncogénica" en tejidos obtenidos de tales fuentes

5 como biopsias y especímenes de cirugía. En otra modalidad, mostramos que los inhibidores etiquetados fluorescentemente tales como PU-H71-FITC2 pueden usarse para medir la abundancia de "HSP90 oncogénica" en líneas celulares de cáncer establecidas o en células cancerosas primarias. Todavía en otra modalidad mostramos que los inhibidores etiquetados fluorescentemente pueden usarse para medir la abundancia de "HSP90 oncogénica" 10 en células aisladas de especímenes de cáncer tales como de tumores, en células madre de cáncer, en células tumorales circulantes y en células cancerosas obtenidas de aspirados por aguja fina. Todavía en otras modalidades, mostramos que los otros inhibidores de HSP90 fluorescentemente etiquetados, etiquetados con ANCA y biotinilados 15 también son útiles para realizar las mediciones mencionadas arriba.

En otra modalidad, el inhibidor de HSP90 etiquetado es un inhibidor radioetiquetado que se enlaza selectivamente a "HSP90 oncogénica". Por ejemplo, diferentes versiones de PU-H71 radioetiquetado se han optimizado para la 15 formación de imágenes PET. En una modalidad particular, las versiones radioetiquetadas de yodo 124 de PU-H71 son para la formación de imágenes PET de tumores sólidos y líquidos. Los inhibidores radioetiquetados pueden usarse para formar en imágenes numerosos tipos de cánceres primarios y metastásicos incluyendo pero no limitados a cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, carcinoma de célula basal, melanoma, 20 carcinoma de célula renal, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, un cáncer pulmonar incluyendo cáncer pulmonar de célula pequeña y cáncer pulmonar de célula no pequeña, cáncer de mama, neuroblastoma, cánceres gastrointestinales incluyendo tumores estromales gastrointestinales, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer anal, tumores cerebrales incluyendo gliomas, linfomas incluyendo linfoma folicular y linfoma de célula B grande difuso, leucemias, mielomas, neoplasias mieloproliferativas y cánceres ginecológicos incluyendo cánceres de ovarios, cervicouterino, y endometriales.

25 La descripción además proporciona medios para medir en una manera tumor por tumor la abundancia del "HSP90 oncogénica" en tumores sólidos tales como, pero no limitados a, aquellos tumores enlistados arriba y en tumores líquidos, tales como, pero no limitados a, aquellos asociados con linfomas, leucemias, mielomas y neoplasias mieloproliferativas. En una modalidad, la invención muestra que por el uso de inhibidores de HSP90 etiquetados con Yodo 124 que interactúan específicamente con el "HSP90 oncogénica" es posible usar formación de imágenes PET 30 no invasivamente y cuantificar el "HSP90 oncogénica" en pacientes, en tumores sólidos y tumores líquidos.

En un aspecto, la descripción proporciona un método para determinar si un paciente con malignidades hematológicas tales como cáncer en la sangre (*por ejemplo*, leucemias) probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende poner en contacto una muestra que contiene células cancerosas del paciente y células no cancerosas de referencia con un inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado permeable a la 35 célula que se enlaza preferencialmente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en las células cancerosas del paciente, medir la cantidad de inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas y no cancerosas en la muestra, y comparar la cantidad del inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas con la cantidad del inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células no cancerosas, en donde una cantidad mayor de inhibidor de 40 HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas que las células no cancerosas indica que el tumor probablemente responderá al inhibidor de HSP90.

En tal modalidad las células normales de referencia son células normales (*por ejemplo*, linfocitos) que son del mismo paciente como las células cancerosas. En otra modalidad, las células no cancerosas de referencia se obtienen de un paciente diferente del paciente con cáncer.

45 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para determinar si un paciente con un tumor sólido probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende poner en contacto una muestra, tal como obtenida de una biopsia, cirugía, aspirados por aguja fina u otro procedimiento intervencional, que contiene células cancerosas y células no cancerosas del paciente (*por ejemplo* estroma circundante, células benignas u otros tipos de células normales en el espécimen) con un inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado permeable a la 50 célula que se enlaza preferencialmente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en las células cancerosas del paciente, medir la cantidad de inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas y células no cancerosas en la muestra, y comparar la cantidad del inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas con la cantidad del inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células no cancerosas, en donde una cantidad mayor de inhibidor de 55 HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas que las células no cancerosas indica que el tumor probablemente responderá al inhibidor de HSP90.

La descripción también proporciona un método para determinar si un paciente con un tumor sólido probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende poner en contacto una muestra que contiene células cancerosas circulantes y células no cancerosas (*por ejemplo*, leucocitos) del paciente con un inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado permeable a la célula que se enlaza preferencialmente a una forma específica 60

del tumor de HSP90 presente en las células cancerosas del paciente, medir la cantidad de inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas y no de cáncer en la muestra, y comparar la cantidad del inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas con la cantidad del inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células no cancerosas, en donde una cantidad mayor de inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas que las células no cancerosas indica que el tumor probablemente responderá al inhibidor de HSP90.

5 En una modalidad alternativa, las células no cancerosas de referencia se obtienen de un paciente diferente del paciente con el tumor.

10 En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para usar inhibidores de HSP90 radioetiquetados para determinar los pacientes que serán susceptibles a la terapia de inhibición de HSP90.

En tal modalidad, la descripción proporciona métodos para determinar si un paciente con cáncer con un tumor que puede detectarse mediante diagnóstico por imágenes probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

- 15 (a) administrar al paciente un inhibidor de HSP90 radioetiquetado que se enlaza preferencialmente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en el tumor o en células del tumor del tumor;
- (b) medir la absorción del inhibidor de HSP90 radioetiquetado por el tumor del paciente en uno o más puntos de tiempo después de la administración en la etapa (a);
- (c) medir la absorción del inhibidor de HSP90 radioetiquetado por un tejido saludable predeterminado o sangre del paciente en uno o más puntos de tiempo después de la administración en la etapa (a);
- 20 (d) calcular una relación de la absorción medida en uno o múltiples puntos de tiempo en la etapa (b) con la absorción medida en los mismos puntos de tiempo en la etapa (c); y
- (e) determinar la probabilidad de que el paciente con cáncer responda a la terapia con el inhibidor de HSP90, en donde una relación mayor que 2 calculada en la etapa (d) en uno o múltiples puntos de tiempo indica que el paciente probablemente responderá.

25 En otra modalidad, la descripción proporciona un método para determinar si un paciente con cáncer con un tumor que puede detectarse mediante diagnóstico por imágenes probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

- 30 (a) administrar al paciente un inhibidor de HSP90 radioetiquetado que se enlaza preferencialmente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en el tumor o en células tumorales del tumor;
- (b) medir la absorción del inhibidor de HSP90 radioetiquetado por el tumor del paciente en uno o más puntos de tiempo más de 4 horas después de la administración en la etapa (a),

en donde una absorción del inhibidor en uno o más puntos de tiempo en relación con la absorción en tejido saludable que rodea el tumor indica que el paciente probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90.

35 Aún en otra modalidad, la descripción proporciona un método para determinar si un tumor que puede detectarse mediante diagnóstico por imágenes probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

- 40 (a) administrar al paciente un inhibidor de HSP90 radioetiquetado que se enlaza preferencialmente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en el tumor o en células tumorales del tumor;
- (b) inspeccionar visualmente por PET la absorción del inhibidor radioetiquetado en el tumor o en células tumorales del tumor en uno o más puntos de tiempo 2 horas o más después de la administración del inhibidor de HSP90 radioetiquetado en la etapa (a),
- (c) comparar la imagen PET obtenida en la etapa (b) con la imagen PET obtenida en tejido saludable que rodea el tumor en uno o más puntos de tiempo;

45 en donde la presencia de una región iluminada en la imagen PET en el tumor o en células tumorales del tumor en uno o más puntos de tiempo indica que el paciente probablemente responderá a la terapia de inhibición de HSP90.

Todavía en otra modalidad, la descripción proporciona un método para determinar si un paciente con cáncer específico con un tumor que expresa la HSP90 oncogénica responderá a la terapia con una dosis definida de un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

- 50 (a) administrar al paciente una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 que se enlaza

preferencialmente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en el tumor o en células tumorales del tumor;

- (b) medir la absorción de la forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 por el tumor del paciente en uno o más puntos de tiempo después de la administración en la etapa (a);
- 5 (c) calcular para la dosis definida del inhibidor de HSP90, las concentraciones del inhibidor de HSP90 que deberán presentarse en el tumor del paciente en cada uno o más de los puntos de tiempo, basadas en la absorción medida en uno o más puntos de tiempo en la etapa (b); y
- (d) comparar las concentraciones del inhibidor de HSP90 calculadas en la etapa (c) con concentraciones de referencia del inhibidor de HSP90 que deberán necesitarse para estar presentes en el tumor en uno o más puntos de tiempo para el inhibidor de HSP90 para ser efectivos al tratar el tumor,

10 en donde el paciente probablemente responderá a la terapia con la dosis definida del inhibidor de HSP90 si las concentraciones del inhibidor de HSP90 calculadas en la etapa (c) igualan o exceden las concentraciones del inhibidor de HSP90 necesarias para tratar efectivamente el tumor.

15 En otro aspecto, mostramos que los inhibidores de HSP90 radioetiquetados pueden usarse para determinar dosis y programas de dosificación efectivos de inhibidores de HSP90.

En tal modalidad, la descripción proporciona un método para determinar si un paciente con cáncer específico con un tumor que expresa el HSP90 oncogénica responderá a la terapia con una dosis definida de un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

- 20 (a) administrar al paciente una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 que se enlaza preferencialmente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en el tumor o en células tumorales del tumor;
- (b) medir la absorción de la forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 por el tumor del paciente en uno o más puntos de tiempo después de la administración en la etapa (a);
- 25 (c) calcular para la dosis definida del inhibidor de HSP90, las concentraciones del inhibidor de HSP90 que estarían presentes en el tumor del paciente en cada uno o más de los puntos de tiempo, basadas en la absorción medida en uno o más puntos de tiempo en la etapa (b); y
- (d) comparar la exposición del tumor para el inhibidor de HSP90 calculada en la etapa (c) con una exposición de referencia para el inhibidor de HSP90 que se necesitaría que esté presente en el tumor en uno o más puntos de tiempo para el inhibidor de HSP90 para ser efectivos al tratar el tumor,

30 en donde el paciente probablemente responderá a la terapia con la dosis definida del inhibidor de HSP90 si la exposición del tumor para el inhibidor de HSP90 calculada en la etapa (c) iguala o excede la exposición del tumor para el inhibidor de HSP90 necesaria para tratar efectivamente el tumor.

35 Las modalidades adicionales incluyen un método para determinar, para un paciente con cáncer específico con un tumor que puede detectarse mediante diagnóstico por imágenes, una dosis efectiva y frecuencia de administración para terapia con un inhibidor de HSP90; un método para determinar la concentración de un inhibidor de HSP90 presente en un tumor que puede detectarse mediante diagnóstico por imágenes en un paciente con cáncer; y un método para determinar o vigilar la capacidad de respuesta a la terapia con un inhibidor de HSP90 de un tumor en un paciente con cáncer.

40 Aún en otra modalidad, esta descripción proporciona un método para determinar, para un paciente con cáncer específico con un tumor que expresa la HSP90 oncogénica, una dosis efectiva y frecuencia de administración para la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

- 45 (a) administrar al paciente una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 que se enlaza preferencialmente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en un tumor o células tumorales;
- (b) medir la absorción de la forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 por el tumor del paciente en uno o más puntos de tiempo después de la administración en la etapa (a); y
- 50 (c) calcular la dosis y frecuencia de administración necesarias para mantener en el tumor en cada uno o más de los puntos de tiempo una concentración del inhibidor de HSP90 efectiva para tratar el tumor, basadas en la absorción medida en uno o más puntos de tiempo en la etapa (b), y por lo tanto determinar, para el paciente con cáncer, la dosis efectiva y frecuencia de administración para la terapia con el inhibidor de HSP90.

Todavía en otra modalidad, esta descripción proporciona un método para determinar, para un paciente con cáncer

específico con un tumor que expresa la HSP90 oncogénica, una dosis efectiva y frecuencia de administración para la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

- (a) administrar al paciente una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 que se enlaza preferencialmente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en un tumor o células tumorales;
- (b) medir la absorción de la forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 por el tumor del paciente en uno o más puntos de tiempo después de la administración en la etapa (a); y
- (c) calcular la dosis y frecuencia de administración necesaria para mantener en el tumor durante el periodo de tratamiento una concentración de tumor promedio del inhibidor de HSP90 efectiva para tratar el tumor, basadas en la absorción medida en uno o más puntos de tiempo en la etapa (b), y por lo tanto determinar, para el paciente con cáncer, la dosis efectiva y frecuencia de administración para la terapia con el inhibidor de HSP90.

Todavía en un aspecto adicional, la descripción proporciona un método para determinar la concentración de un inhibidor de HSP90 presente en un tumor que expresa la HSP90 oncogénica en un paciente con cáncer que comprende las siguientes etapas:

- (a) coadministrar al paciente una cantidad predeterminada del inhibidor de HSP90 y una cantidad de una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 que se enlaza preferencialmente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en un tumor o células tumorales;
- (b) medir periódicamente la absorción del inhibidor de HSP90 radioetiquetado por el tumor del paciente en uno o más puntos de tiempo después de la coadministración en la etapa (a); y
- (c) determinar la concentración del inhibidor de HSP90 presente en el tumor en cualquier punto de tiempo basado en las mediciones de la absorción del inhibidor de HSP90 radioetiquetado en la etapa (b).

Aún en otro aspecto, la descripción proporciona un método para determinar la capacidad de respuesta a la terapia con un inhibidor de HSP90 de un tumor que expresa la HSP90 oncogénica en un paciente con cáncer que comprende las siguientes etapas:

- (a) administrar una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 que se enlaza preferencialmente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en un tumor o células tumorales, al paciente en uno o más puntos de tiempo dentro del periodo durante el cual el paciente está recibiendo el inhibidor de HSP90 como terapia;
- (b) medir la concentración del inhibidor de HSP90 radioetiquetado en el tumor del paciente en uno o más puntos de tiempo después de la administración en la etapa (a); y
- (c) comparar las concentraciones del inhibidor de HSP90 radioetiquetado medidas en la etapa (b) con la concentración mínima del inhibidor de HSP90 necesaria para tratar efectivamente el tumor, en donde las concentraciones medidas mayores que la mínima necesaria para tratar el tumor indica que el paciente es probable que responda a la terapia con el inhibidor de HSP90.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para determinar si un paciente que sufre de una enfermedad neurodegenerativa responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

- (a) poner en contacto el cerebro con un inhibidor de HSP90 radioetiquetado que se enlaza preferencialmente a una forma patogénica de HSP90 presente en las células del cerebro del paciente;
- (b) medir la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado a las células del cerebro en la muestra; y
- (c) comparar la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado a las células del cerebro en la muestra medida en la etapa (b) a una cantidad de referencia;

en donde una cantidad mayor de inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado a las células del cerebro medida en la etapa (b) como se compara con la cantidad de referencia indica que el paciente probablemente responderá al inhibidor de HSP90.

En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para tratar cánceres dependientes de HSP90 con el inhibidor de HSP90 PU-H71. En modalidades particulares, se proporcionan métodos para tratar cánceres dependientes de HSP90 para lograr exposiciones de tumor específicas de PU-H71. En otras modalidades, se proporcionan regímenes de dosificación novedosos de PU-H71.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para determinar si un cáncer humano presente en un paciente probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende:

- (a) obtener una muestra que contiene células del cáncer del paciente, cuyas células expresan proteína HSP90 sola o además de la proteína HSP70;
- 5 (b) evaluar para las células presentes en la muestra obtenida en la etapa (a) la presencia de al menos uno de los siguientes parámetros: una vía AKT activada, un defecto en la expresión o función supresora del tumor PTEN, una vía STAT5 activada, o expresión de proteína Bcl-xL; y
- 10 (c) comparar la evaluación obtenida en la etapa (b) con una evaluación de referencia predeterminada del mismo parámetro o parámetros evaluados en la etapa (b) para células cancerosas humanas de uno o más pacientes con cáncer quienes responden a la terapia con el inhibidor de HSP90 con el fin de determinar por ello si el cáncer del paciente probablemente responderá a la terapia con el inhibidor de HSP90.

En una modalidad, los cánceres humanos actualmente de interés considerable para el uso de este método particular son cáncer de mama, cáncer pancreático y leucemia mieloide aguda.

Los métodos para evaluar cada uno de los parámetros son bien conocidos en el arte y fácilmente disponibles. Sin embargo una correlación de uno o más de estos parámetros particulares con la predicción de eficacia de un inhibidor de HSP90 no se ha mostrado previamente. Aunque en teoría un parámetro sencillo puede ser suficiente para permitir a un médico experimentado predecir la eficacia de cualquier inhibidor de HSP90 dado, es más probable que al menos 2, quizás al menos 3 o más o incluso todos de estos parámetros necesitarán tomarse en cuenta para hacer una predicción sólida de eficacia.

Breve descripción de las figuras

20 **Figura 1** PU-H71 preferencialmente interactúa con una fracción restringida de HSP90 que es más abundante en células cancerosas. (a) Las etapas de inmunopurificación secuenciales con H9010, un anticuerpo anti-HSP90, HSP90 disminuido en el extracto celular MDA-MB-468. Lisado = extracto celular de control. (b) HSP90 de extractos MDA-MB-468 se aisló a través de etapas químicas y de inmunopurificación secuenciales. La cantidad de HSP90 en cada grupo se cuantificó por densitometría y los valores se normalizaron a un estándar interno. (c) Se realizaron los estudios de saturación con ^{131}I -PU-H71 en las células indicadas. Todas las muestras celulares aisladas se contaron y la absorción específica de ^{131}I -PU-H71 se determinó. Estos datos se graficaron contra la concentración de ^{131}I -PU-H71 para dar una curva de enlace de saturación. Se presentan los datos representativos de cuatro repeticiones separadas (*inferiores*). La expresión de HSP90 en las células indicadas se analizó por Western blot (*superior*). (d) Se pretrataron células sanguíneas de cordón umbilical (CB), CD34+ primarias de AML y CML, o células K562 con las dosis indicadas de PU-H71 durante 24 h. Se trataron células de postratamiento con PU-FITC 1 μM . El enlace de PU-FITC a las células se evaluó por citometría de flujo y se representa como la intensidad de fluorescencia media (MFI). TEG-FITC se muestra como un control de enlace no específico. Se usó separación CD45 contra SSC para distinguir el enlace a blastocitos o linfocitos de los especímenes primarios. (e) Porcentaje de viabilidad en relación con el control no tratado para células de AML y CML, CD34+ CB o K562 primarias después del tratamiento en las dosis indicadas de PU-H71. Se evaluó la viabilidad celular por tinción con anexina V/7-AAD 96 h después del tratamiento. Se presentan los datos como media \pm SE ($n = 3$).

40 **Figura 2.** PU-H71 es selectivo para y ásla HSP90 en complejo con oncoproteínas y cochaperonas. (a) Complejos HSP90 en extractos de K562 se aislaron por precipitación con H9010, una IgG no específica, o por perlas PU-H71 o de control. Las perlas de control contienen etanolamina, una molécula inerte HSP90. Las proteínas retenidas en el soporte (*pull-downs*) se analizaron por Western blot. (b, c) Inmuno y precipitaciones químicas sencillas o secuenciales, como se indican, se realizaron en extractos de K562 con H9010 y PU en perlas en la frecuencia indicada y en la secuencia mostrada. Las proteínas retenidas en el soporte (*pull-down*) y en el sobrenadante restante se analizaron por WB. NS = no específico. (d) Se trataron células K562 durante 24h con vehículo (-) o PU-H71 (+), y las proteínas se analizaron por Western blot. (e) La expresión de proteínas en células con genes inactivados Hsp70 se analizó por Western blot (*izquierda*) y los cambios en los niveles de proteína se presentaron en unidades de luminiscencia relativas (RLU, por sus siglas en inglés) (*derecha*). Control = siRNA revuelto. (f) Las precipitaciones químicas secuenciales, como se indica, se realizaron en extractos de K562 con perlas GM, SNX y NVP en la frecuencia indicada y en la secuencia mostrada. Las proteínas retenidas en el soporte y en el sobrenadante restante se analizaron por Western blot. (g) HSP90 en células K562 existe en complejo tanto con proteínas aberrantes, Bcr-Ab1, como normales, c-Ab1. PU-H71, pero no H9010, selecciona para la población HSP90 que se enlaza a la oncoproteína Bcr-Abl.

55 **Figura 3. (a, b)** Se aislaron HSP90 de extractos de células cancerosas de mama y CML (120 μg) a través de etapas de inmunopurificación y purificación química en serie, como se indica. El sobrenadante se aisló para analizar la HSP90 sobrante. HSP90 en cada fracción se analizó por Western blot. Lisado = contenido de proteína endógena; las perlas de PU, GM y control indican proteínas aisladas en las perlas particulares. H9010 e IgG indican proteína aislada por el A β particular. Las perlas de control contienen una molécula inerte HSP90. Los datos son consistentes con aquellos obtenidos de experimentos de repetición múltiple ($n \geq 2$). (c) Enlace HSP90 de anticuerpo conjugado PE contra PU-H71-FITC. El porcentaje de HSP90 celular total aislado por PU-H71 se indica para cada línea celular arriba de la barra de datos. (d) Las etapas de inmunopurificación y purificación química secuenciales se realizaron

en extractos de leucocitos de sangre periférica (PBL) (250 µg) para aislar especies HSP90 específicas de PU-H71 y H9010. Todas las muestras se analizaron por Western blot (*superior*). El enlace a HSP90 en PBL se evaluó por citometría de flujo usando un anticuerpo HSP90-PE y PU-H71-FITC. FITC-TEG = control para enlace no específico (*inferior*). (e) Correlación para el enlace de PU-H71-FITC (1 µM) para HSP90 contra el porcentaje de viabilidad después del tratamiento con PU-H71 en un panel de 14 líneas celulares de leucemia: Kasumi-1, Kasumi-4, KCL-22, REH, TF-1, KG-1, HL-60, OCI-AML3, K562, MOLM-13, TUR, THP-1, U937 y MV4-11. Los niveles de HSP90 totales en estas células son similares, como se demuestra por Western blot (no se muestra).

Figura 4. (a) Las gráficas de punto de citometría de flujo demuestran la estrategia de apertura usada para muestras de leucemia mieloide crónica (CML) primarias para distinguir los blastocitos (CD45dim, círculos rojos) y los linfocitos no malignos (círculos azules). (b) Relación para enlace PU-H71-FITC a HSP90 en blastocitos CML respecto a linfocitos normales de las muestras del paciente con CML primario mostradas en la (a). (c) Porcentaje de viabilidad de blastocitos de CML (rojo) o linfocitos normales (azul) en relación con el control no tratado para las muestras de CML primarias mostradas en (a) después del tratamiento en los puntos de tiempo y dosis de PU-H71 indicados. (d) Las gráficas de punto de citometría de flujo demuestran la estrategia de apertura usada para muestras de CML de fase crónica primarias (cpCML) para distinguir blastocitos (CD45dim, círculo rojo) y linfocitos no malignos (círculo azul) y para analizar el enlace de células CD34+ (cuadrado rojo) dentro de la ventana de blastocito (CD45dim, círculo rojo). Las gráficas de punto de CD45 contra SSC fueron prerreguladas en células viables basadas en discriminación 7-AAD. (e) Relación para enlace PU-H71-FITC a HSP90 en células CD34+ de CML en fase crónica (cpCML) y para linfocitos normales. (f) Porcentaje de viabilidad de células CD34+ de cpCML (rojo) y linfocitos normales (azul) en relación con el control no tratado después del tratamiento durante 48h con PU-H71-FITC o TEG-FITC 1µM. (g) Relación para enlace PU-H71-FITC a Hsp90 en células CD34+ y linfocitos de células sanguíneas de cordón normales, CML en fase crónica (cpCML) y fase de blastocito (bpCML) (n=5). (h) Porcentaje de viabilidad después de 48h de tratamiento con PU-H71 (1 µM) de células CD34+ de blastocito y CML crónica, y células CD34+ normales (de sangre de cordón; CB) en relación con el control no tratado. La viabilidad celular en los paneles de la **Figura c, f, y h** se evaluó por tinción con anexina V/7-AAD. Se presentan los datos como media ± SE (n = 3).

Figura 5. (a) Dentro de las células normales, la expresión constitutiva de HSP90 se requiere para su función de mantenimiento evolucionariamente conservada de plegamiento y traslocación de proteínas celulares a su comportamiento celular apropiado (“complejo de organización”). Durante la transformación maligna, las proteínas celulares se perturban a través de mutaciones, hiperactividad, retención en compartimientos celulares incorrectos u otros medios. La presencia de estas proteínas funcionalmente alteradas se requiere para iniciar y mantener el fenotipo maligno, y son estas proteínas oncogénicas las que se mantienen específicamente por un subconjunto de HSP90 modificado por tensión (“complejo oncogénico”). PU-H71 se enlaza específicamente a la fracción de HSP90 que actúa de chaperona con las proteínas oncogénicas (“complejo oncogénico”). (b) HSP90 y sus cochaperonas que interactúan se aislan en extractos celulares de K562 usando perlas de PU y control, y Abs inmovilizadas por H9010 e IgG. Las perlas de control contienen una molécula inerte HSP90. (c) HSP90 de extractos de célula K562 se aisló a través de tres etapas de inmunopurificación en serie con el anticuerpo específico H9010 HSP90. El sobrenadante restante se aisló para analizar las proteínas sobrantes. Las proteínas en cada fracción se analizaron por Western blot. Lisado = contenido de proteína endógena. Los datos son consistentes con aquellos obtenidos de múltiples experimentos de repetición (n ≥ 2).

Figura 6. GM y PU-H71 son selectivos para proteína aberrante/especie HSP90. (a) Las especies HSP90 enlazadas a Bcr-Ab1 y Ab1 se vigilaron en experimentos donde un volumen constante de perlas PU-H71 (80 µL) se analizó con cantidades indicadas de lisado celular K562 (*izquierda*), o donde una cantidad constante de lisado (1 mg) se analizó con los volúmenes indicados de perlas PU-H71 (*derecha*). (b) (*izquierda*) Las perlas PU y GM (80 µL) reconocen el complejo B-Raf de HSP90-mutante en el extracto celular de melanoma SKMel28 (300 µg), pero no interactúa con el complejo HSP90-TN B-Raf encontrado en los extractos CCD18Co de fibroblasto de colon normales (300 µg). H9010 HSP90 Ab reconoce ambas especies HSP90. (c) En el extracto celular MDA-MB-468s (300 µg), perlas PU y GM (80 µL) interactúan con HER3 y Raf-1 cinasa pero no con la cinasa de proteína tirosina no oncogénica CSK, una tirosina cinasa relacionada con c-Src, y p38. (d) (*derecha*) Las perlas PU (80 µL) interactúan con v-Src/HSP90 pero no con especies c-Src/HSP90. Para facilitar la detección c-Src, una proteína en abundancia inferior que v-Src, cantidades superiores de lisado celular 3T3 que expresa c-Src (1000 µg) se usaron cuando se comparan con la célula 3T3 transformada por v-Src (250 µg), proporcionando una explicación para los niveles de HSP90 superiores detectados en las células 3T3 (Lisado, fibroblastos 3T3 contra fibroblastos v-Src 3T3). Lisado = contenido de proteína endógena; las perlas PU, GM y control indican proteínas aisladas en las perlas particulares. El HSP90 Ab e IgG indican proteína aislada por el Ab particular. Las perlas de control contienen una molécula inerte HSP90. Los datos son consistentes con aquellos obtenidos de múltiples experimentos de repetición (n ≥ 2).

Figura 7. Las precipitaciones químicas sencillas se realizaron en líneas celulares de CML que expresan Bcr-Abl (**a**) y en extractos celulares de CML primarios (**b**) con perlas PU y Control. Las proteínas retenidas en el soporte se analizaron por Western blot. Diversos productos de escisión Bcr-Abl se notan en las muestras de CML primarias como se reportan⁹⁰. N/A = no disponibles.

Figura 8. Estructuras de diversos inhibidores de HSP90.

Figura 9. Los ligandos fluorescentes para la proteína de choque de calor 90 (HSP90) sintetizados que contienen ya

sea isotiocianato de fluoresceína (FITC), 4-nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol (NBD) o el pigmento que cambia a rojo de sulfurodamina 101 (Rojo Texas) conjugado para PU-H71.

Figura 10. Los reactivos y condiciones para el esquema de reacción muestran: (a) FITC, Et₃N, DMF, ta, 12 h, 40%; (b) cloruro de sulfonilo Rojo Texas, DMF, 0-10°C, 12 h, 61%; (c) DMF, ta, 20 h, 47%.

5 **Figura 11.** Los reactivos y condiciones para el esquema de reacción muestran: (a) FITC, Et₃N, DMF, ta, 5 h, 72%; (b) NBD-Cl, Et₃N, DMF, ta, 12 h, 40%.

Figura 12. Los reactivos y condiciones para el esquema de reacción muestran: (a) N-(3-bromopropil)-ftalimida, Cs₂CO₃, DMF, ta, 34%; (b) hidrato de hidrazina, MeOH, CH₂Cl₂, ta, 64%; (c) FITC, Et₃N, DMF, ta, 12 h, 74%; (d) NBD-Cl, Et₃N, DMF, ta, 12 h, 42%.

10 **Figura 13.** (A) Las células MOLM-13 se trataron con los derivados PU-H71-fluorescentes indicados (1 μM) a 37°C durante 4h y el enlace a células vivas (DAPI negativo) se midió por citometría de flujo. La extensión de enlace se muestra como intensidad de fluorescencia media (MFI). (B) Las células MOLM-13 se trataron con los derivados PU-H71-fluorescentes indicados (1 μM) a 37°C durante 24h. Su viabilidad se determinó por exclusión DAPI. (C) Las células MOLM-13 se trataron con los derivados PU-H71-fluorescentes indicados (1 μM) durante 24h. El nivel de estado constante de las proteínas cliente HSP90 mFLT3 y Raf-1 se analizó por Western blot. Se usó β-Actina para normalizar la carga de proteína igual.

15 **Figura 14.** (A) La microscopía de fluorescencia confocal de células de leucemia teñidas con PU-H71-FITC2 muestra localización intracelular prominente. (B) Una muestra de leucemia mieloide aguda primaria se pretrató con la dosis indicada de PU-H71 o vehículo (no tratado) durante 24 h. Se trataron células de postratamiento con PU-H71-FITC2 o TEG-FITC 1 μM. El enlace de PU-H71-FITC2 y TEG-FITC a las células se evaluó por citometría de flujo y se representa como intensidad de fluorescencia media (MFI). TEG-FITC se muestra como un control de enlace no específico. Se usó una clasificación de CD45 frente a SSC para distinguir el enlace al blastocito (células malignas) o linfocitos (células normales) de los especímenes primarios.

20 **Figura 15.** El espectro de emisión de fluorescencia de PU-ANCA en una célula normal (izquierda) y una célula cancerosa de mama (derecha). El perfil de emisión espectral de células cancerosas de mama resulta en un pico de emisión fluorescente en aproximadamente una longitud de onda de 530nm, la emisión de fluorescencia representativa del enlace PU-H71-ANCA.

25 **Figura 16.** (a) Relación para el enlace de PU-H71-FITC a HSP90 en sangre del condón y blastocitos de CML respecto de linfocitos normales de donadores saludables (sangre del cordón) y pacientes con CML en fase de blastocito y crónica (cpCML y bpCML, respectivamente). No se señala enlace importante a la sangre del cordón umbilical de pacientes saludables contra enlace incrementado en CML que se correlaciona con el progreso de la enfermedad. (b) Porcentaje de viabilidad después de 48h de tratamiento con PU-H71 (1 μM) de células CD34+ de CML en fase de blastocito y crónica, y células CD34+ normales (de sangre del cordón umbilical; CB) en relación con el control no tratado. La viabilidad celular se evaluó por tinción con anexina V/7-AAD. Se presentan los datos como media ±SE (n = 3). (c) Correlación para enlace de PU-H71-FITC (1 μM) a HSP90 contra porcentaje de viabilidad después del tratamiento con PU-H71 500nM durante 48h en un conjunto de 19 muestras de paciente con AML primarias. Cada punto representa una muestra de AML primaria. Cada experimento se realizó al menos por duplicado. Estas células expresan niveles similares de HSP90 totales.

30 **Figura 17.** Los ensayos de xenotrasplante sugieren sensibilidad in vivo para el tratamiento PU-H71 de muestras de AML con enlace alto de PU-FITC. (a) Porcentaje de viabilidad en 48h para tratamiento PU-H71 in vitro de dos muestras de AML primarias que muestran baja y alta absorción de PU-FITC (b). Se determinó la viabilidad por ensayos de Anexina/7AAD. (b) Las células de médula ósea de animales xenotransplantados (para muestras de AML mostradas en el panel a) se tiñeron con anticuerpos específicos humanos para determinar el enlace PU-FITC. El enlace PU-FITC se representa como una relación de células humanas (leucemia)/de murino (normales). (c) Porcentaje de células tumorales CD34+ en animales tratados con 75mg/kg PU-H71 3x semana durante 3 semanas.

35 **Figura 18.** Uso de PU-H71 etiquetado para detectar y cuantificar el “HSP90 oncogénica” y predecir la sensibilidad de células tumorales a inhibidores de HSP90. (A) Correlación para el enlace de PU-H71-FITC (1 μM) a HSP90 contra porcentaje de viabilidad después del tratamiento con PU-H71, SNX-2112 o NVP-AUY922 1 μM durante 48h en un panel de líneas celulares pancreáticas y cáncer de mama. El enlace se mide como una relación de absorción de PU-FITC en la célula cancerosa respectiva y la absorción en las células de referencia, las células de leucemia HL60 resistentes a HSP90 (ver panel D). (B) La expresión de HSP90 de tumor total se midió por Western blot y graficó contra el enlace de PU-FITC. (C) Porcentaje de viabilidad después del tratamiento con PU-H71, SNX-2112 o NVP-AUY922 1 μM durante 48h en un panel de líneas celulares de cáncer pancreático y de mama se graficó contra la expresión de HSP90 de tumor total. (D) Enlace de HSP90 de anticuerpo conjugado PE contra PU-H71-FITC en una línea celular de AML de sensibilidad y enlace bajo (HL-60) y sensibilidad y enlace alto (MV4-11). Se presentan los datos como media ±SE (n = 3).

40 **Figura 19.** Relación del enlace de PU-H71-FITC2 a células tumorales y a células de leucemia HL-60 de referencia. Las células que responden (>50% de viabilidad reducida) y sin respuesta (<50% de viabilidad reducida) podrían

diferenciarse por una relación del enlace a PU-H71-FITC2 desde alrededor de 2.7 hasta alrededor de 5.87 o más para las células que responden comparado con hasta alrededor de 1.23 hasta alrededor de 2.07 o menos para células sin respuesta.

Figura 20. Acumulación de PU-H71-FITC2 en Células tumorales Circulantes EpCAM+: Los PBMC aislados de sangre entera se pretrataron con PU-FITC o controles (PU-FITC9, DMSO, 1 μ M/ 2 x10⁶ células/ml, 4hrs). Las células luego se tiñeron con anticuerpos CD45, CD14 y EpCAM. **(A)** Las células se regulan para excluir células muertas. Las células viables luego se regulan para determinar células EpCAM+ contra CD45+. Los monocitos se excluyen del análisis al regular las células CD45+ además como FSC contra CD14. **(B)** Las gráficas de histograma que muestran la intensidad de fluorescencia media PU-FITC (MFI) de células CD45+CD14- (azul) y células EpCAM+ (Rojas). La acumulación de fármaco en células EpCAM+ es calculada como la relación MFI EpCAM+/MFI CD45+CD14- (células tumorales/leucocitos) después de sustraer los valores de los controles DMSO circulantes y PU-FITC9 (usados como control para enlace no específico y de respaldo).

Figura 21. Muestra la absorción de PU-H71-FITC2 por diferentes clones Ly1 y se expresa como intensidad de fluorescencia media. La sensibilidad de estas células para inhibidores de HSP90 se correlaciona con su absorción de PU-H71 etiquetado. La expresión de HSP90 de tumor total en estas células tumorales se midió por Western blot (inserción).

Figura 22 (a-c). Correlación en Toxicidad y Enlace de PU-H71 en Células cancerosas Pancreático. **(A)** Enlace en Células Vivas; células cancerosas pancreático (1x10⁶ células) se trataron durante 6hrs con PUH71-FITC2 (1 μ M) o controles [TEG-FITC (1 μ M) o DMSO]. Las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora FACS (PBS, FBS al 0.05%), y tiñeron con 1 μ g/ml de DAPI (Invitrogen) en solución amortiguadora FACS a temperatura ambiente, antes del análisis. Las intensidades de fluorescencia de células vivas (DAPI negativo) que representan enlace derivado fluorescente PU-H71 se capturaron por citometría de flujo (LSR-II, BD Biosciences), y analizaron por software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). El valor representa intensidades fluorescentes medias sustraídas de los controles de DMSO y TEG-FITC. **(B)** Toxicidad; las células cancerosas pancreático (1x10⁶ células) se trataron durante 48hrs con PU-FITC2 (1 μ M). Las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora FACS (PBS, FBS al 0.05%), y tiñeron con 1 μ g/ml de DAPI (Invitrogen) en solución amortiguadora FACS a temperatura ambiente y capturaron por citometría de flujo (LSR-II, BD Biosciences). Los valores representan el % de células vivas (DAPI negativo) normalizados para los valores del control de DMSO. **(C)** Análisis correlativo; el MFI y toxicidad obtenidos de A y B se agruparon en el eje x e y respectivamente y se realizó un análisis de regresión lineal correlativa.

Figura 23. (A) El enlace de PUH71-FITC2 a células madre de leucemia (LSCs, CD34+CD38- CD45dim). Las muestras de AML primarias se incubaron con PU-H71-FITC2 1 μ M a 37°C durante 4 h. Las células se tiñeron con CD34, CD38, CD45 y 7-AAD seguido por análisis de citometría de flujo. El enlace de PU-H71 a LSCs se muestra como la intensidad de fluorescencia media (MFI) en células vivas (7-AAD negativo). **(B)** Porcentaje de viabilidad de LSCs relativo al control no tratado de tres muestras de AML primarias después de 48 horas de tratamiento con PUH71 1 μ M. Las células se tiñeron con CD45, CD34 y CD38 antes de la tinción con Anexina V y 7-AAD. La viabilidad de LSCs se midió por citometría de flujo y determinó como el porcentaje de Anexina V-/7AAD- de la ventana CD45dim CD34+CD38-.

Figura 24. Los tumores tienen una absorción de [¹²⁴I]-PU-H71 distinta, lo que indica diferencias en su contenido de "HSP90 oncogénica" y de esta manera en su potencial para responder a la terapia de HSP90. Las imágenes de [¹²⁴I]-PU-H71 de PET 24h después de la inyección de [¹²⁴I]-PU-H71 se midieron como Valores de Absorción Estandarizados Máximos (SUV_{max}) en diversos pacientes con cáncer de mama. BC = cáncer de mama. TNBC-BC triple negativo.

Figura 25. Relación de Tumor:músculo SUV para un número selecto de pacientes que responden a la terapia de inhibición de HSP90 como se determina por PET después de la administración de [¹²⁴I]-PU-H71. En estos pacientes, el SUV tumor:músculo incrementa con el paso del tiempo. Los valores promedio para diversos tumores negativos y positivos se presentan.

Figura 26. FDG/CT y [¹²⁴I]-PU-H71 PET/CT de paciente con linfoma de células del manto. El paciente muestra visualización clara de la lesión 30min después de la inyección [¹²⁴I]-PU-H71. No se apreció absorción [¹²⁴I]-PU-H71 en este tumor en tiempos posteriores (3.5-24h y más allá).

Figura 27. [¹²⁴I]-PU-H71 PET/CT de paciente con cáncer de mama recurrente en los dos ganglios linfáticos (LN) indicados. Las imágenes PET en diversos tiempos después de la inyección [¹²⁴I]-PU-H71 (0.1, 0.4, 0.6, 3.5 y 21.4h) se cuantificaron y los datos SUVmax obtenidos por [¹²⁴I]-PU-H71 se convirtieron a concentraciones HSP90i para una dosis administrada de PU-H71 de 10mg/m². La exposición de los dos tumores a PU-H71 con el paso del tiempo de 0 hasta 24h también se calculó y representó como el área bajo la curva (AUC). Las imágenes transaxiales CT (izquierda), PU-PET/CT (medias), y de fusión FDG-PET/CT (derecha) demuestran [¹²⁴I]-PU-H71-avidez en uno de los ganglios linfáticos enfermos pero no en el otro lo que sugiere que es menos probable que la lesión en el ganglio linfático del ángulo anterior tranqueobronquial izquierdo (TAALN) responda a la terapia de HSP90 que el ángulo tranqueobronquial izquierdo LN (TALN).

Figura 28. Un paciente con cáncer de mama triple negativo se evaluó mediante diagnóstico por imágenes con ^{124}I -PU-H71 PET. A los 20min después de la inyección, la absorción se ve en una masa pulmonar (flecha izquierda), y una lesión ósea (flecha derecha) (**A**), pero a las 24h la absorción se aprecia únicamente en la lesión pulmonar (**B**). Tanto los tumores pulmonares como óseos se confirman por exploraciones CT y FDG (**C**). El paciente inició el tratamiento con el inhibidor de HSP90 STA-9090. Veinte días después del tratamiento del inhibidor de HSP90, la lesión del pulmón pero no la ósea se reduce notablemente en tamaño, como se evidencia tanto por CT como por FDG-PET (**D**).

Figura 29. ^{124}I -PU-H71 PET/CT de un paciente con cáncer de mama HER2 metastásico en el ganglio paratraqueal. Las imágenes PET en los tiempos indicados después de ^{124}I -PU-H71 o después de la coinyección de ^{124}I -PU-H71 con 10mg/m² PU-H71 se midieron como Valores de Absorción Estandarizados Máximos (SUV_{max}). Los datos SUV obtenidos para ^{124}I -PU-H71 se convirtieron a concentraciones HSP90i para una dosis administrada de PU-H71 de 10mg/m². La exposición del tumor a PU-H71 durante el tiempo de 0 hasta 48h también se calculó y representó como el área bajo la curva (AUC). Las concentraciones de tumor de PU-H71 (en valores micromolares) como se estiman a partir de ^{124}I -PU-H71 PET o como se determina a partir de ^{124}I -PU-H71 PET después de la coinyección de ^{124}I -PU-H71/PU-H71 son comparables.

Figura 30. ^{124}I -PU-H71 PET es un ensayo no invasivo para los inhibidores de HSP90. (**a**) La estructura química de PU-H71 y ^{124}I -PU-H71. (**b**) Exploración PET representativa de ^{124}I -PU-H71 en ratones que portan el tumor MDA-MB-468. La ubicación del tumor se indica por una flecha roja. (**c**) Las relaciones de concentración de la actividad de tumor a órgano ^{124}I -PU-H71 para los tiempos indicados después de la administración. (**d**) La biodistribución de ^{131}I -PU-H71 en tumores MDA-MB-468 y plasma (n=5). Tumor – S y Tumor – L, tumores pequeños y grandes, respectivamente. (*inserción*) La fase de aclaramiento terminal lenta de 24 hasta 140h de PU-H71 de tumores se analizó usando un ajuste de curva de regresión lineal como se implementa en GraphPad Prism.

Figura 31. ^{124}I -PU-H71 PET predice exactamente el suministro de concentraciones de PU-H71 terapéuticamente efectivas en el tumor. (**a**) La distribución de PU-H71 en el tumor predicha con base en el %ID/g medio generado por ^{124}I -PU-H71 PET (*inferior*). La concentración del tumor predicha en los tiempos indicados p.a. de las dosis de PU-H71 indicadas (*superior*). (**b**) Concentraciones de PU-H71 en el tumor (n=5) después de la administración del agente de 75 mg/kg como se predice por ^{124}I -PU-H71 PET, y determina por LC-MS/MS y por ^{124}I -PU-H71 PET después de la coinyección de ^{124}I -PU-H71 y PU-H71. (**c, d**) Los análisis Western blot representativos de tumores MDA-MB-468 a los que se les administró PU-H71 en las dosis indicadas y analizados a las 24 h p.a. (**c**) y de células MDA-MB-468 tratadas durante 24h con las concentraciones indicadas de PU-H71 (**d**). Los blots (n=3) se cuantificaron por densitometría y el cambio en los niveles de proteína se grafican contra la concentración de PU-H71 (*paneles derechos*). (**e, f**) La ocupación objetivo a las 24h p.a. como se predice por ^{124}I -PU-H71 PET después de la coadministración de cantidades indicadoras de ^{124}I -PU-H71 mezcladas con las dosis indicadas de PU-H71.

Figura 32. ^{124}I -PU-H71 PET predice el diseño de un régimen de dosis eficaz para la terapia con HSP90. (**a**) La distribución de PU-H71 en el tumor predicha cuando se administra durante 2 semanas en las dosis indicadas en un programa 3x semana (lunes-miércoles-viernes con sábado/domingo fuera) basado en la concentración de la actividad del tumor media (%ID/g) derivada por ^{124}I -PU-H71 PET. (*inserción*) Las AUCs para PU-H71 en tumores se calcularon usando GraphPad Prism. (**b**) La viabilidad de células MDA-MB-468 tratadas durante 48h con las dosis indicadas de PU-H71 se analizó por tinción con Bromuro de Etidio/Anaranjado de Acridina (*superior*). La apoptosis del tumor estimada inducida por el ^{124}I -PU-H71 PET predicho indicó las concentraciones de PU-H71 en el tumor mínimas y promedio. (**c**) A los ratones que portan el tumor MDA-MB-468 (n = 5) se les administraron i.p. las dosis indicadas de PU-H71 en un programa de 3x semanas. Se vigilaron el peso del ratón y volumen del tumor durante el periodo de tratamiento indicado. (**d**) A los ratones que portan el tumor MDA-MB-468 (n = 5) se les administraron i.p. las dosis indicadas de PU-H71 en un programa de 3x semanas. Se vigilaron el peso del ratón y el volumen del tumor durante el periodo de tratamiento indicado. (**e**) La distribución de PU-H71 en el tumor predicha basada en la concentración de la actividad del tumor media (%ID/g) derivada por ^{124}I -PU-H71 PET cuando se administra en la dosis indicada en un programa de 3x semanas (lunes-miércoles-viernes con sábado/domingo fuera). (**f**) El análisis Western blot de los tumores tratados con vehículo (Control) y PU-H71 (5 mg/kg) sacrificados el jueves, 24 h p.a. de la última dosis. Las concentraciones de PU-H71 en el tumor, como se determina por LC-MS/MS, se indican para cada tumor. (**f**) Análisis de los datos (n=5) del panel (**d**).

Figura 33. ^{124}I -PU-H71 PET predice el diseño de un régimen posológico eficaz para la terapia con HSP90. (**a**) La distribución de PU-H71 en el tumor predicha basada en la concentración de la actividad del tumor media (%ID/g) derivada por ^{124}I -PU-H71 PET cuando se administran 75 mg/kg en los programas indicados. (**b**) La apoptosis del tumor estimada inducida por las concentraciones de PU-H71 en el tumor mínimas y promedio indicadas como se predice a partir del análisis *in vitro*. (**c**) A los ratones que portan el tumor MDA-MB-468 (n = 5) se les administraron PU-H71 i.p. (75 mg/kg) en los programas indicados. Se vigilaron el peso del ratón y el volumen del tumor durante el periodo de tratamiento indicado. (**d**) El análisis Western blot y (**e**) LC-MS/MS de los tumores tratados con PU-H71 (75 mg/kg) en el programa de 1x semana sacrificados el jueves, a las 24h y el jueves, a las 96h p.a. de la última dosis. Control; ratones tratados únicamente con vehículo.

Figura 34. La exposición del tumor a PU-H71 como se predice por PU-PET para un paciente pancreático con enfermedad metastásica en el pulmón y ganglios linfáticos indicados. Las concentraciones del tumor se calculan

basadas en una dosis administrada de 20mg/m². La exposición plasmática también se muestra en rojo. AUCs calculadas ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$) para el periodo 0 hasta 192h se tabulan a la derecha.

Figura 35. [¹²⁴I]-PU-H71 PET/CT de un paciente con cáncer pancreático con enfermedad recurrente en el pulmón. Las imágenes PET en los tiempos indicados después de la inyección de [¹²⁴I]-PU-H71 (48 y 196h, paneles izquierdos) se cuantificaron y los datos SVU obtenidos para [¹²⁴I]-PU-H71 se convirtieron a concentraciones de PU-H71 en el tumor para las dosis administradas indicadas de PU-H71. La exposición de dos tumores, uno en el pulmón izquierdo y otro en el LN de hilio derecho, a PU-H71 durante el tiempo de 0 hasta 336h durante un tratamiento de dos semanas en un programa de dos veces por semana (martes y viernes) y una dosis administrada de 20, 60 y 80 mg/m² (paneles inferiores y derechos superiores) también se calculó y representó como el área bajo la curva (AUC) y como una concentración del tumor promedio.

Figura 36. El panel posológico muestra la biodistribución de ¹²⁴I-PU-H71 durante 0 hasta 72h en el tumor de un paciente con cáncer de mama según se obtiene por PU-PET. Los datos se usaron para simular la exposición del tumor a una dosis administrada de 10mg/m² cuando se da dos veces a la semana durante dos semanas con un fin de semana de descanso, tres veces a la semana durante dos semanas con el fin de semana de descanso, una vez a la semana durante dos semanas con el fin de semana de descanso y cinco veces a la semana durante dos semanas con el fin de semana de descanso.

Figura 37. [¹²⁴I]-PU-H71 PET predice la magnitud de la respuesta a la terapia de HSP90. (a) La ocupación promedio predicha de los sitios HSP90 del tumor por PU-H71 cuando se administran en las dosis indicadas y en los programas indicados. (b, c) La correlación de la ocupación de los sitios HSP90 del tumor con el efecto antitumoral observado se analizó en GraphPad Prism.

Figura 38. El uso del ensayo ¹²⁴I-PU-H71 PET en el desarrollo clínico de los inhibidores de HSP90: (a) al determinar la dosis del inhibidor de HSP90 necesaria para lograr las concentraciones del tumor efectivas, selección del paciente elegible para la terapia de HSP90 y al diseñar una dosis eficaz y régimen posológico; (b) al analizar la concentración real del fármaco suministrado al tumor y predecir el resultado clínico en la terapia de HSP90 y (c) al determinar la "dosis del tumor máxima". CR = respuesta completa, PR = respuesta parcial, NR = sin respuesta.

Figura 39. Diagnóstico por imágenes PET in vivo de [¹²⁴I]-PU-DZ13 y [¹²⁴I]-PU-H71 en ratones TNBC de xenoinjerto MDA-MB-468. El diagnóstico por imágenes PET se condujo en ya sea un escáner R4 o PET específico para animales pequeños Focus 120 (Concord Microsystems, Inc., Knoxville, TN); la formación de imágenes anatómica separada se condujo en un escáner CT específico para animales pequeños (ImTek, Inc., Oak Ridge, TN), usando un dispositivo de restricción estereotáctica construido a medida. La proyección de intensidad máxima (MIP) de conjuntos de datos de imagen CT y PET se registraron anatómicamente, y las imágenes superpuestas se generaron usando una mezcla de transparencia alfa de datos PET y CT.

Figura 40. Los casos de BC muestran una respuesta dependiente de la dosis a PU-H71. Las diapositivas teñidas con H y E exhiben áreas importantes de apoptosis que contienen tanto células picnóticas (indicativas de apoptosis de etapa temprana) y células cariorréticas (representativas de apoptosis de última fase) cuando el tumor es altamente sensible a PU-H71. (A) La apoptosis/muerte celular en especímenes TNBC tratados durante 48h con las concentraciones indicadas de PU-H71 se cuantificó y graficó contra la concentración de PU-H71. Tanto las, células apoptóticas como necróticas/apoptóticas tardías se contaron y agregaron al % de apoptosis como se representa en el eje y. Se señala un agrupamiento de casos en tres grupos sensibles (curvas superiores más inclinadas, más sensible, LN15 y LN16; curvas medias, sensibles, PT12, PT17, PT25, PT28 y LN10 y curvas inferiores, menos sensibles, PT10, PT15, PT16 y PT30). De forma interesante, las metástasis del ganglio linfático muestran una sensibilidad superior que el tumor primario en dosis equivalentes. PT= tumor primario, LN= ganglio linfático. Los tumores más sensibles a PU-H71 también son de alta tinción para p-Akt. (B) Igual que para (A) con especímenes de HER2+, TNBC y pacientes ER+ BC tratados durante 24 o 48h con PU-H71.

Figura 41. La sensibilidad apoptótica a la inhibición de HSP90 se correlaciona con la adicción de las células para la sobrevivencia en las vías AKT y STAT pero no en MEK. (A), (B) Se incubaron células de AML representativas para los tiempos indicados con las concentraciones indicadas de los inhibidores de HSP90, AKT, JAK y MEK y la apoptosis se evaluó usando el método de Anaranjado de Acrídina/Bromuro de Etidio. Los datos son consistentes con aquellos obtenidos de múltiples experimentos de repetición ($n \geq 3$). Puntos, medias; barras, s.d. (C) Los % de los valores de apoptosis de célula tratada durante 72h con AKTi, MEKi y JAKi solo se graficaron contra aquellos obtenidos durante el tratamiento del inhibidor de HSP90 y se realizó un análisis de regresión lineal como se implementó en Prism 4.0.

Figura 42. Las células primarias de AML con los niveles más altos de p-STAT5 también son las más sensibles a PU-H71. (A) Los niveles de fosfo-STAT5 en células de blastocitos (CD45dim regulado) representados como intensidad de fluorescencia media (MFI) para tres diferentes muestras de AML primarias. El nivel de fosforilación de Stat5 se evaluó por citometría de flujo. (B) Porcentaje de viabilidad de blastocito de AML relativo al control no tratado de tres muestras de AML primarias después de 48 horas de tratamiento con PUH71 1 μM . Las células se tiñeron con CD45 antes de la tinción de Anexina V y 7-AAD. La viabilidad de las células de blastocito de AML se midió por citometría de flujo y determinó como el porcentaje de Anexina V-/7AAD- de la ventana CD45dim contra SSC para blastocitos

de AML.

Figura 43. Se administraron a ratones 8-10 mo 3xTg (**A**) 75mg/kg o (**B**) la dosis indicada del inhibidor de HSP90 PU-HZ151 y el marcador PD, HSP70, se midió en el hipocampo, una región del cerebro afectada en este modelo de AD, 24h después de la administración. HSP70 se induce cuando HSP90 se inhibe y su inducción es un indicador de que

5 los niveles terapéuticos del inhibidor de HSP90 se suministraron a la región del cerebro de interés. (**C**) Los niveles del inhibidor de HSP90 en las regiones del cerebro indicadas y en el plasma se determinaron por LC-MS/MS después de la administración de 50mg/kg PU-HZ151. Los niveles del inhibidor de HSP90 en tiempos diferentes 10 después de una inyección ip única se muestran en unidades micromolares. La exposición del cerebro también se 15 midió como el área bajo la curva (AUC).

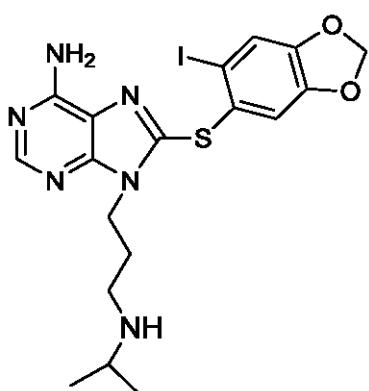
Figura 44. PU-H71 es selectivo para HSP90. (**A**) El gel de tinción Coomassie de diversos soportes con perla del 10 inhibidor de HSP90. Los lisados K562 (60 µg) se incubaron con 25 µL de las perlas indicadas. Después de lavarse con la solución amortiguadora indicada, las proteínas retenidas en el soporte se aplicaron a un gel SDS-PAGE. (**B**) Se probó PU-H71 (10 µM) en la pantalla scanMAX (Ambit) contra 359 cinasas. El mapa de interacción TREEspot™ 15 para PU-H71 se presenta. Únicamente SNARK (familia NUAK cinasa 2 tipo SNF-1) (punto rojo en el árbol de la cinasa) aparece como un resultado de cinasa de afinidad baja potencial de la molécula pequeña.

Descripción detallada

5.1. HSP90 oncogénica como un biomarcador específico de tumor

La descripción proporciona evidencia que la abundancia de esta especie "HSP90 oncogénica" particular, que no es 20 dictada por la expresión de la HSP90 sola, predice la sensibilidad a la terapia de inhibición de HSP90, y de esta manera es un biomarcador para la terapia de HSP90. La descripción también proporciona evidencia de que la identificación y medición de la abundancia de esta especie de HSP90 oncogénica en tumores predice la respuesta a la terapia de HSP90.

En las siguientes secciones, los inventores muestran que el inhibidor de HSP90 PU-H71 fija como objetivo los complejos de HSP90 enriquecidos con tumor y captura por afinidad las proteínas clientes oncogénicas dependientes 25 de HSP90. El compuesto PU-H71 se dio a conocer en la Patente de E.U.A. No. 7.834.181. PU-H71 tiene la siguiente estructura química:



PU-H71

El PU-H71 se puede administrar como una base libre o como una sal farmacéuticamente aceptable.

Además, los inventores muestran que la abundancia de la especie HSP90 enriquecida con PU-H71, que no es 30 dictada por la expresión de HSP90 sola, es predictiva de la sensibilidad de la célula a la inhibición de HSP90 por PU-H71 y otros inhibidores de HSP90.

5.1.1. Presentación de HSP90 heterogénea en las células cancerosas

Para investigar la interacción de los inhibidores de HSP90 de moléculas pequeñas con complejos de HSP90 tumorales, los inventores hicieron uso de perlas de agarosa unidas covalentemente a ya sea geldanamicina (GM) o 35 PU-H71 (perlas de GM y PU, respectivamente) (**Figuras 1, 2**). Los agentes químicamente distintos, tanto GM como PU-H71, interactúan con e inhiben la HSP90 al ligarse a su bolsa reguladora de dominio de terminal N³⁵. Para comparación, los inventores también generaron perlas de agarosa de proteína G acopladas a un anticuerpo anti-HSP90 (H9010).

Primero los inventores evaluaron la ligación de estos agentes a HSP90 en cáncer de mama y en lisados de células

de leucemia mieloide crónica (CML). Cuatro etapas de inmunoprecipitación consecutivas (IP) con H9010, pero no con una IgG no específica, agotaron eficientemente la HSP90 de estos extractos (**Figura 1a**, 4xH9010 y no mostrados). En contraste, las retenciones en el soporte secuenciales con perlas de PU o GM removieron solamente una fracción de la HSP90 celular total (**Figuras 1b, 3a, 3b**). Específicamente, en las células cancerosas de mama

5 MDA-MB-468, las fracciones de perlas de PU combinadas representaron aproximadamente 20-30% de la acumulación de HSP90 celular total, y además la adición de alícuotas de perlas de PU recientes no lograron precipitar la HSP90 restante en el lisado (**Figura 1b**, perlas de PU). Esta fracción de HSP90 restante, agotada de PU, mientras que es inaccesible a la molécula pequeña, mantuvo afinidad para H9010 (**Figura 1b**, H9010). A partir de esto, los inventores concluyeron que una fracción significativa de HSP90 en los extractos de células MDA-MB-468 aún fue una conformación nativa pero no reactiva con PU-H71.

Para excluir la posibilidad de que los cambios en la configuración de HSP90 en los lisados celulares hagan que no esté disponible para ligarse al PU-H71 inmovilizado pero no al anticuerpo, los inventores analizaron la ligación de ^{131}I -PU-H71 radioetiquetado a HSP90 en las células cancerosas intactas (**Figura 1c, inferior**). Las estructuras químicas de ^{131}I -PU-H71 y PU-H71 son idénticas: El PU-H71 contiene un átomo de yodo estable (^{127}I) y ^{131}I -PU-H71

15 contiene yodo radioactivo; de esta manera, el ^{131}I -PU-H71 isotópicamente etiquetado tiene propiedades químicas y biológicas idénticas al PU-H71 no etiquetado. La ligación de ^{131}I -PU-H71 a HSP90 en varias líneas de células cancerosas se saturó en un número bien definido, aunque distinto de sitios por célula (**Figura 1c, inferior**). Los inventores cuantificaron la fracción de la HSP90 celular que se ligó por PU-H71 en células MDA-MB-468. Primero,

20 los inventores determinaron que la HSP90 representó 2.66-3.33% de la proteína celular total en estas células, un valor que coincidió en gran medida con la abundancia reportada de la HSP90 en otras células tumorales ³³.

Aproximadamente 41.65×10^6 de células MDA-MB-468 se lisaron para producir $3875 \mu\text{g}$ de proteínas, de las cuales $103.07-129.04 \mu\text{g}$ fueron HSP90. Una célula, por lo tanto, contuvo $(2.47-3.09) \times 10^{-6} \mu\text{g}$, $(2.74-3.43) \times 10^{-11} \mu\text{moles}$ o $(1.64-2.06) \times 10^{-7}$ de moléculas de HSP90. En las células MDA-MB-468, el ^{131}I -PU-H71 se ligó a la mayoría de 5.5×10^{-6} de los sitios de ligación celulares disponibles (**Figura 1c, inferior**), que cuantifica 26.6-33.5% de la HSP90 celular

25 total (calculada como $5.5 \times 10^{-6} / (1.64-2.06) \times 10^{-7} * 100$). Este valor es notablemente similar al obtenido con las retenciones en el soporte de perlas de PU en los extractos celulares (**Figura 1b**), confirmando que el PU-H71 se liga a una fracción de HSP90 en células MDA-MB-468 que representa aproximadamente 30% de la acumulación de HSP90 total y que valida el uso de perlas de PU para aislar eficientemente esta acumulación. En K562 y otras líneas de células t(9;22)+ CML establecidas, el PU-H71 se ligó al 10.3-23% de HSP90 celular total (**Figuras 1c, 3b, 3c**).

30 Después, los inventores extendieron sus estudios a varias células de leucemia primarias y a células de sangre normal. Entre estas se encontraron muestras de CML crónica y de fase blástica primarias y leucemia mieloide aguda (AML) que contuvieron tanto blastocitos (población de células malignas) como linfocitos (población de células normales), células CD34+ aisladas de la sangre del cordón umbilical de donadores sanos, células mononucleares totales de sangre periférica y también leucocitos de sangre periférica (PBLs) (**Figuras 1c-e, 3, 4**). Los inventores

35 usaron un PU-H71 etiquetado con fluoresceína (PU-FITC). Esta herramienta química permite el análisis citométrico de flujo, en poblaciones de células heterogéneas, de PU-H71 que se liga a las poblaciones de células distintas usando marcadores de superficie celular, así como la investigación de la sensibilidad de las células a PU-H71. Un FITC derivado de tetraetilenglicol (FITC-TEG) se usó para controlar la ligación no específica (**Figura 1d**).

40 El PU-H71 se ligó eficientemente a HSP90 en células K562 y en los blastocitos CML y AML con una mitad de afinidad de ligación relativa (EC_{50}) de 116, 201 y 425 nM, respectivamente (**Figura 1d**). En contraste, su afinidad por células de sangre normal fue más débil con EC_{50s} más alta que 2,000nM (**Figuras 1d, 3d**). La HSP90 se sigue expresando sumamente en estas células de sangre normal como se indica por la ligación sustancial al anticuerpo HSP90 (**Figura 3d**).

45 Las células con avidez más alta para PU-H71 también fueron más sensibles al exterminio por el agente (**Figuras 1e, 3e, 4**). Cuando se evaluaron en un panel de línea de células de CML y AML y muestras primarias, se observó una correlación significativa entre la capacidad del PU-H71 de ligarse a la HSP90 y el potencial de exterminio de células de PU-H71 contra estas células (**Figuras 3e, 4**).

50 Colectivamente, estos datos muestran que ciertos inhibidores de HSP90, tal como PU-H71, se ligan de manera preferente a un subconjunto de especies de HSP90 que son más abundantes en las células cancerosas que en las células normales (**Figura 5a**). La abundancia de estas especies de HSP90, que no se dicta por el nivel de expresión de HSP90 solo, es predictivo de la sensibilidad de la célula a la inhibición de HSP90, de esta manera la abundancia de esta especie de HSP90 tumoral se puede usar como un biomarcador predictivo de respuesta a la terapia de HSP90.

5.1.2. Oncoproteína y proteína TN ligada a las especies de HSP90 coexistentes en las células cancerosas, pero el PU-H71 selecciona las especies de oncoproteína/HSP90

55 Para explorar las funciones bioquímicas asociadas con estas especies de HSP90, los inventores llevaron a cabo inmunoprecipitaciones (IPs) y precipitaciones químicas (CPs) con perlas de anticuerpo e inhibidor de HSP90, respectivamente, y los inventores analizaron la capacidad de la HSP90 ligada en estos contextos para coprecipitarse con un subconjunto elegido de clientes conocidos. Las células K562 de CML primero se investigaron porque esta

60 línea de células coexpresa la proteína Bcr-Abl aberrante, una cinasa constitutivamente activa, y su contraparte

normal c-Abl. Estas dos especies de Abl son claramente separables por el peso molecular y de esta manera son fácilmente distinguibles por el análisis de Western blot (**Figura 2a**, Lisado), facilitando el análisis de los clientes onco y de tipo natural (TN) de HSP90 en el mismo contexto celular. Los inventores observaron que la H9010, pero no una IgG no específica, aisló la HSP90 en complejo tanto con Bcr-Abl como con Abl (**Figuras 2a, 5c**, H9010). La comparación de la Bcr-Abl y Abl inmunoprecipitadas (**Figuras 2a, 2b, izquierda**, H9010) con la fracción de cada proteína que permanece en el sobrenadante (**Figura 2b, izquierda**, Sobrenadante restante), indicó que el anticuerpo no se enriqueció de manera preferente para HSP90 ligada a la formas ya sea mutantes o TN de la Abl en las células K562.

En contraste, la HSP90 ligada a PU aisló de manera preferente la proteína Bcr-Abl (**Figuras 2a, 2b, derecha**, perlas de PU). Después del agotamiento de las perlas de PU de las especies HSP90/Bcr-Abl (**Figura 2b, derecha**, perlas de PU), el H9010 precipitó las especies de HSP90/Abl restantes (**Figura 2b, derecha**, H9010). Las perlas de PU retuvieron selectivamente las especies de HSP90/Bcr-Abl en condiciones sustancialmente de saturación (es decir exceso de lisado, **Figura 6a, izquierda**, y perlas, **Figura 6a, derecha**). Como confirmación adicional de la selectividad bioquímica del PU-H71 para las especies de Bcr-Abl/HSP90, la Bcr-Abl fue mucho más susceptible a la degradación por PU-H71 de lo que fue la Abl (**Figura 2d**). La selectividad de PU-H71 para la especie de Abl aberrante se prolongó a otras líneas de células t(9;22)+ CML establecidas (**Figura 7a**), así como a las muestras de CML primarias (**Figura 7b**).

5.1.3. La oncoproteína pero no la proteína TN ligada a las especies de HSP90 son más dependientes del reclutamiento de cochaperonas para la regulación de proteínas cliente por HSP90

Para diferenciar adicionalmente entre las fracciones de HSP90 asociadas a PU-H71 y a anticuerpo, los inventores llevaron a cabo experimentos de agotamiento secuenciales y evaluaron la constitución de las cochaperonas de las dos especies³². La fracción de HSP90 que contiene los complejos de HSP90/Bcr-Abl se ligó a varias cochaperonas, incluyendo Hsp70, Hsp40, HOP y HIP (**Figura 2c**, perlas de PU). Las retenciones en el soporte de perlas de PU también se enriquecieron por varias especies de cochaperonas de HSP90 adicionales. Estos descubrimientos sugieren en gran medida que el PU-H71 reconoce la HSP90 ligada a cochaperonas. Las perlas de PU agotadas, la acumulación de HSP90 restante, que mostraron que incluían la especie de HSP90/Abl, no se asoció con las cochaperonas (**Figura 2c**, H9010), aunque su expresión abundante se detectó en el lisado (**Figura 2c**, Sobrenadante restante). Las cochaperonas se aislaron sin embargo por H9010 en el extracto celular total (**Figuras 5b, 5c**).

Estos descubrimientos sugieren la existencia de acumulaciones distintas de HSP90 ligada de manera preferente a ya sea Bcr-Abl o Abl en las células de CML (**Figura 2**). La H9010 se liga a las especies de HSP90 que contienen tanto la Bcr-Abl como la Abl, mientras que PU-H7 es selectivo para las especies Bcr-Abl/HSP90. Los datos de los inventores también sugieren que la HSP90 puede usar y requerir más agudamente las cochaperonas clásicas Hsp70, Hsp40 y HOP cuando modula la actividad de las proteínas aberrantes (es decir Ver-Abl) pero no normales (es decir Abl) (**Figura 5a**). De acuerdo con esta hipótesis, los inventores descubren que la Bcr-Abl es más sensible que la Abl para silenciar genéticamente la Hsp70, y la cochaperona HSP90, en las células K562 (**Figura 2e**).

5.1.4. La selectividad de las especies de oncoproteína/HSP90 y la capacidad de captura compleja de PU-H71 no son compartidos por todos los inhibidores de HSP90

Los inventores evaluaron después si otros inhibidores que interactúan con la bolsa reguladora del extremo Nterminal de HSP90 de una manera similar a PU-H71, incluyendo los inhibidores sintéticos SNX-2112 y NVP-AUY922, y el producto natural GM³⁵, podrían aislar selectivamente las especies de HSP90 similares (**Figura 2f**). Las perlas de SNX mostraron selectividad para Bcr-Abl/HSP90, mientras que las perlas de NVP se comportaron similarmente a H9010 y no discriminaron entre las especies de Bcr-Abl/HSP90 y Abl/HSP90 (véase perlas de SNX contra NVP, respectivamente; **Figura 2f**). Mientras que las perlas de GM también reconocieron una subpoblación de HSP90 en los lisados celulares (**Figura 3a**), fueron mucho menos eficientes que las perlas de PU en la coprecipitación de la Bcr-Abl (**Figura 2f**, perlas de GM). La ineficacia similar para el GM en la captura de los complejos de HSP90/proteína cliente se reportó previamente³⁶.

5.1.5. La selectividad de las especies de oncoproteína/HSP90 y la capacidad de captura compleja de PU-H71 no se restringe a las especies de Bcr-Abl/HSP90

Para determinar si la selectividad hacia las oncoproteínas no se restringió a Bcr-Abl, los inventores sometieron a prueba varias proteínas cliente HSP90 bien definidas adicionales en otras líneas de células tumorales (**Figuras 6b-d**)^{37,38}. De conformidad con los resultados de los inventores en las células K562, la H9010 precipitó HSP90 complejada con tanto el B-Raf mutante expresado en células de melanoma SKMel28 como TN B-Raf expresado en fibroblastos de colon normal CCD18Co (**Figura 6b**, H9010). Las perlas de PU y GM sin embargo, reconocieron selectivamente la HSP90/B-Raf mutante, que muestra poco reconocimiento de HSP90/TN B-Raf (**Figura 6b**, perlas de PU y perlas de GM). Sin embargo, como fue el caso en las células K562, las perlas de GM fueron significativamente menos eficientes que las perlas de PU en la coprecipitación de la proteína cliente mutante. Se obtuvieron resultados similares para otros clientes HSP90 (**Figuras 6c, 6d**).

En resumen, el PU-H71 enriquece una amplia Sección transversal de las proteínas que se precipitan en las vías de señalización vitales al fenotipo maligno en la CML. La interacción de la HSP90 ligada a PU con el signalosoma CML aberrante se retuvo en las muestras de CML primarias.

5.1.6. Proteínas identificadas por PU-H71 y redes son aquellas importantes para el fenotipo maligno

5 Los inventores plantean la hipótesis de que la presencia de estas proteínas en los desplegables de perlas de PU es funcionalmente significativa y sugieren una función para HSP90 en soportar ampliamente el signalosoma maligno en células de CML.

Para mostrar que las redes identificadas por las perlas de PU son importantes para la transformación en las K562, después mostraron que los inhibidores de las proteínas nodales claves de redes individuales Bcr-Abl, NFkB, mTOR, 10 MEK y CAMIIK disminuyen el crecimiento y la proliferación potencial de las células K562.

Después los inventores mostraron que los interactores de HSP90 identificados por perlas de PU sin una función asignada todavía en el CML, también contribuyen al fenotipo transformado. La histona-arginina metiltransferasa CARM1, un coactivador transcripcional de muchos genes⁵⁷, se validó en las retenciones en el soporte de perlas de PU de las líneas de células CML y células CML primarias. Esta es la primera vinculación reportada entre HSP90 y 15 CARM1, aunque otras argininas metiltransferasas, tales como PRMT5, han mostrado que son clientes HSP90 en células cancerosas de ovario⁵⁸. Mientras que los niveles de CARM1 elevados se implican en el desarrollo de cánceres de próstata y mama, poco se conoce sobre la importancia de CARM1 en la leucemogénesis de CML⁵⁷.

Los inventores descubrieron que CARM1 es capturada esencialmente de manera completa por las especies de 20 HSP90 reconocidas por las perlas de PU y también sensible a la degradación por PU-H71. La CARM1 por lo tanto, puede ser una oncoproteína HSP90 novedosa en CML. De hecho, los experimentos de silenciamiento génico con CARM1 pero no con los shRNAs de control, muestran viabilidad e inducción reducida de la apoptosis en K562 pero 25 no en las células CD34+ normales (no mostradas), lo que apoya esta hipótesis. Los datos de qPCR confirmaron que los niveles de CARM1 mRNA se redujeron notablemente por los dos shRNAs diferentes (datos no mostrados).

Para mostrar que la presencia de proteínas en las retenciones en el soporte de PU es debido a su participación en la 30 señalización aberrantemente activada y no simplemente su expresión abundante, los inventores compararon las retenciones en el soporte de perlas de PU de K562 y Mia-PaCa-2, una línea de células cancerosas pancreáticas. Mientras que ambas células expresan altos niveles de la proteína STAT5, la activación de la vía de STAT5, como es mostrada por la fosforilación de STAT5 y la ligación de DNA⁵⁹, se observó solamente en las células K562. Por consiguiente, esta proteína se identificó solo en las retenciones en el soporte de perlas de PU de K562. En contraste, la STAT3 activada se identificó en los complejos de PU-HSP90 de los extractos de células tanto K562 como Mia-PaCa-2.

La vía mTOR se identificó por la perlas de PU en las células tanto K562 como Mia-PaCa-2, y de hecho, su inhibición farmacológica por PP242, un inhibidor selectivo que fija como objetivo el dominio ATP de mTOR⁶⁰, es tóxico para ambas células. Por otra parte, el inhibidor de Abl Gleevec⁶¹ fue tóxico solo para las células K562. Ambas células expresan Abl pero solo la K562 tiene las perlas de Bcr-Abl y Pu oncogénicas que identifican Abl, y Bcr-Abl, en K562 pero no en las células Mia-PaCa-2.

5.1.7. El PU-H71 identifica un mecanismo novedoso de activación de STAT oncogénica

Las retenciones en el soporte de perlas de PU contienen varias proteínas, incluyendo Bcr-Abl⁴¹, CAMKII⁵², FAK⁵³, 40 vav-1⁶² y PRKD2⁴⁸ que son constitutivamente activadas en la leucemogénesis de CML. Estos son clientes regulados por HSP90 clásicos que dependen de HSP90 para su estabilidad debido a que sus niveles de estado permanente disminuyen en la inhibición de HSP90^{32,33}. La activación constitutiva de STAT3 y STAT5 también se reporta en CML^{41,46}. Estas proteínas, sin embargo, no se adaptan a los criterios de las proteínas cliente HSP90 clásicas debido a que los niveles de STAT5 y STAT3 permanecen sin modificar esencialmente la inhibición de HSP90. Las retenciones en el soporte de PU también contienen proteínas aisladas potencialmente como parte de un 45 megacomplejo de señalización activo, tal como mTOR, VSP32, VSP15 y RAPTOR⁴⁴. La actividad de mTOR, como es medida por los niveles celulares de p-mTOR, también parece que son más sensibles a la inhibición de HSP90 que los componentes complejos (es decir, comparan la disminución relativa en p-mTOR y RAPTOR en las células tratadas con PU-H71). Además, los complejos de PU-HSP90 contienen proteínas adaptadoras tales como GRB2, DOCK, CRKL y EPS15, que ligan la Bcr-Abl a los efectores claves a múltiples vías de señalización aberrantemente 50 activadas en K562^{30,41}. Su expresión también permanece sin cambio en la inhibición de HSP90. Por lo tanto los inventores quisieron saber si la contribución de HSP90 a ciertas vías oncogénicas se extiende más allá de sus acciones de plegamiento clásicas. Específicamente, los inventores mostraron que la HSP90 también actúa como una molécula de andamiaje que mantiene los complejos de señalización en su configuración activa, como se ha postulado previamente^{40,63}.

5.1.8. La HSP90 se liga a e influye en la conformación de STAT5

Para investigar esta hipótesis los inventores se enfocaron adicionalmente en la STAT5, que se fosforila constitutivamente en CML⁶⁴. El nivel total de p-STAT5 se determina por el balance de los eventos de fosforilación y

desfosforilación. De esta manera, los altos niveles de p-STAT5 en las células K562 pueden reflejar ya sea un incremento en la actividad de la cinasa cadena arriba o una disminución en la actividad de la proteína tirosina fosfatasa (PTPasa). Una interacción directa entre HSP90 y p-STAT5 también podría modular los niveles celulares de p-STAT5.

5 Para diseccionar la contribución relativa de estos mecanismos potenciales, los inventores primero investigaron el efecto de PU-H71 en la cinasas principales y las PTPasas que regulan la fosforilación de STAT5 de las células K562. La Bcr-Abl activa directamente la STAT5 sin la necesidad de la fosforilación JAK⁶⁴. Concordantemente, la fosforilación de STAT5 disminuyó rápidamente en presencia del inhibidor de Bcr-Abl Gleevec. Mientras que la HSP90 regula la estabilidad de Bcr-Abl, la reducción en los niveles de Bcr-Abl de estado permanente después de la inhibición de HSP90 requiere más de 3 h⁶⁵. De hecho, ningún cambio en la expresión o función de la Bcr-Abl, como es evidenciado por ninguna disminución en la fosforilación de CRKL, se observó con el PU-H71 en el intervalo de tiempo que redujo los niveles de p-STAT5. También, no se observó cambio en la actividad y expresión de HCK, un activador de cinasa de STAT5 en células 32Dcl3 transfectadas con Bcr-Abl⁶⁶.

10 15 De esta manera la reducción de la fosforilación de p-STAT5 por PU-H71 en el intervalo de 0 a 90 min es improbable que se explique por la desestabilización de Bcr-Abl u otras cinasas.

20 Los inventores por lo tanto examinaron si la disminución rápida en los niveles de p-STAT5 en presencia de PU-H71 puede explicarse por un incremento en la actividad de la PTPasa. La expresión y la actividad de SHP2, la STAT5 fosfatasa citosólica principal⁶⁷, los inventores tampoco alteraron dentro de este intervalo de tiempo. Similamente, los niveles de SOCS1 y SOCS3, que forman un bucle de retroalimentación negativo que cambia la señalización de STAT⁶¹ no estuvieron afectados por el PU-H71.

25 De esta manera la falta de un efecto en el STAT5 en el intervalo de 0-90min se puede atribuir probablemente a un cambio en la actividad de la cinasa o fosfatasa hacia STAT5 tras la inhibición de HSP90. Como un mecanismo alternativo, y debido a que la mayoría de p-STAT5 pero no STAT5 es HSP90 ligada en las células de CML, se planteó la hipótesis de que los niveles celulares de la STAT5 activada se afinan por la ligación directa a HSP90.

30 35 40 45 50 El ciclo de inactivación/activación de las STATs implica su transición entre diferentes conformaciones de dímeros. La fosforilación de STATs se presenta en una conformación de dímeros antiparalela que en la fosforilación desencadena una confirmación de dímeros paralela. La desfosforilación de STATs por otra parte requiere reorientación espacial extensiva, ya que los dímeros de STAT fosforilados con tirosina deben cambiar de una configuración paralela a antiparalela para exponer la fosfo-tirosina como un mejor objetivo para las fosfatases⁶⁸. Los inventores descubrieron que STAT5 es más susceptible a la escisión con tripsina cuando se liga a HSP90, indicando que la ligación de HSP90 modula directamente el estado conformacional de STAT5, potencialmente para mantener la STAT5 en una conformación desfavorable para la desfosforilación y/o favorable para la fosforilación.

Para investigar esta probabilidad los inventores usaron una estrategia de pulso-persecución en la cual ortovanadato (Na_3VO_4), un inhibidor de PTPasa no específico, se agregó a las células para bloquear la desfosforilación de STAT5. El nivel residual de p-STAT5 luego se determinó en varios puntos de tiempo posteriores. En ausencia de PU-H71, la p-STAT5 se acumuló rápidamente, mientras que en su presencia, los niveles de p-STAT5 celulares se disminuyeron. La cinética de este proceso fue similar a la velocidad de la reducción del estado permanente de p-STAT5.

5.1.9. La HSP90 mantiene la STAT5 en una conformación activa directamente dentro de los complejos transcripcionales que contienen STAT5.

40 45 50 Además de la fosforilación y dimerización de la STAT5, la actividad biológica de la STAT5 requiere su translocación nuclear y ligación directa a sus diversos genes objetivo^{64,68}. Los inventores se preguntaron por lo tanto, si la HSP90 podría también facilitar la activación transcripcional de los genes de STAT5, y de esta manera participar en los complejos de transcripción de STAT5 asociados al promotor. Usando un ensayo basado en ELISA, los inventores descubrieron que la STAT5 es constitutivamente activa en las células K562 y se liga una secuencia de consenso de ligación de STAT5 (5'-TTCCCGGAA-3'). La activación de STAT5 y la ligación de DNA se anulan parcialmente, en una manera dependiente de la dosis, en la inhibición de HSP90 con PU-H71. Adicionalmente, los ensayos ChIP cuantitativos en las células K562 revelaron la presencia de tanto HSP90 como STAT5 en los objetivos de STAT5 críticos *MYC* y *CCND2*. Tampoco la proteína estuvo presente en las regiones de control intergénicas (no mostradas). Por consiguiente, el PU-H71 (1 μM) disminuyó la abundancia de mRNA de los genes objetivo de STAT5 *CCND2*, *MYC*, *CCND1*, *BCL-XL* y *MCL1*⁶², pero no de los genes de control *HPRT* y *GAPDH*.

55 Colectivamente, estos datos muestran que la actividad de STAT5 se regula positivamente por HSP90 en las células CML. Los descubrimientos de los inventores son consistentes con un escenario mediante el cual la HSP90 que se liga a la STAT5 modula la conformación de la proteína y por este mecanismo altera la cinética de fosforilación/desfosforilación de STAT5, cambiando el balance hacia los niveles incrementados de p-STAT5. Además, la HSP90 mantiene la STAT5 en una conformación activa directamente dentro de los complejos transcripcionales que contienen STAT5. Considerando la complejidad de la vía de STAT, otros mecanismos potenciales sin embargo, no se pueden excluir. Por lo tanto, además de su función en promover la estabilidad de la proteína, la HSP90 promueve la oncogénesis al mantener las proteínas cliente en una configuración activa.

Más ampliamente, los datos revelan que es la fracción de PU-H71-HSP90 de la HSP90 celular la que se implica más estrechamente en soportar las funciones de la proteína oncocénica en las células tumorales, y un PU-H71 etiquetado se puede usar para identificar esta especie de HSP90 tumoral que se liga a una sección transversal amplia de las vías de las proteínas requeridas para mantener el fenotipo maligno en las células tumorales específicas.

5.1.10. La HSP90 está presente en dos formas distintas en las células tumorales.

Los métodos presentados en lo anterior aprovechan las diversas propiedades del PU-H71 que i) se liga de manera preferente a la fracción de HSP90 que se asocia con las proteínas cliente oncocénicas, y ii) fija la HSP90 en una configuración ligada al onco-cliente.

10 La identificación de los clientes de HSP90 requeridos para la supervivencia de las células tumorales también puede servir como biomarcadores específicos de tumor para la selección de pacientes que posiblemente se beneficien de la terapia de HSP90 y para la supervisión fármacodinámica de la eficacia del inhibidor de HSP90 durante los ensayos clínicos (es decir, los clientes cuya expresión o fosforilación cambia en la inhibición de HSP90). El perfil del cliente HSP90 específico del tumor proporciona un procedimiento para la orientación terapéutica personalizada de 15 los tumores.

Este trabajo corrobora y exhibe significativamente el trabajo de Kamal y colaboradores, proporcionando un entendimiento más sofisticado del modelo original en el cual la HSP90 en los tumores se describe como completamente presente en los complejos de múltiples chaperonas, mientras que la HSP90 de los tejidos normales existe en un estado no formado en complejo, latente³⁴. Los inventores muestran que la HSP90 forma complejos 20 bioquímicamente distintos en las células cancerosas (Figura 5a). En este respecto, una fracción principal de la HSP90 de células cancerosas retiene las funciones chaperonas "constitutivas" similares a las células normales, mientras que una acumulación de HSP90 funcionalmente distinta enriquecida o expandida en las células cancerosas interactúa específicamente con las proteínas oncocénicas requeridas para mantener la supervivencia de las células 25 tumorales. Tal vez esta fracción de HSP90 representa una forma específica de estrés celular del complejo de chaperonas que se expande y mantiene constitutivamente en el contexto de células tumorales. Los datos de los inventores sugieren que pueden ejecutar funciones necesarias para mantener el fenotipo maligno. Una función es regular el plegamiento de las proteínas mutadas (es decir, mB-Raf) o quiméricas (es decir, Bcr-Abl)^{32,33}. Ahora los inventores presentan evidencia experimental para una función adicional; es decir, para facilitar la formación de 30 andamios y complejos de las moléculas implicadas en los complejos de señalización aberrantemente activados. En este documento los inventores describen tal función para la HSP90 en el mantenimiento de la señalización de STAT5 constitutiva en CML. Estos datos son consistentes con el trabajo previo en el cual los inventores mostraron que la HSP90 fue requerida para mantener los complejos de represión transcripcional funcionales por el represor transcripcional oncocénico BCL6 en las células de linfoma de células B⁷⁰.

35 ¿Qué distingue la fracción de ligación a PU de la HSP90 de la fracción de no ligación a PU? Esta es una pregunta muy compleja que permanece bajo investigación activa. Aunque las isoformas tanto HSP90 α como HSP90 β son reconocidas por el PU-H71, los datos de los inventores proporcionan evidencia de al menos una diferencia entre los complejos de chaperonas Bcr-Abl/HSP90 (que prefiere PU) y Abl/HSP90 (que no prefiere PU). Es decir, los complejos de chaperonas Bcr-Abl/HSP90 contienen una variedad de cochaperonas (sugiriendo que un proceso de 40 chaperonas activo está en curso, soportado adicionalmente por la sensibilidad de Bcr-Abl al silenciamiento de Hsp70), mientras que los complejos de Abl/HSP90 carecen de cochaperonas asociadas (probablemente representando la Abl aislada pero no activamente chaperona, soportada por la insensibilidad de Abl a el silenciamiento genético de Hsp70) (véase Figura 2e). Adicionalmente, los inventores han observado que la HSP90 que es mutada para que se ligue más ávidamente a sus proteínas cliente también se liga más ávidamente que la HSP90 de tipo natural a las perlas de PU (manuscrito en preparación). Finalmente, los inventores han observado un 45 impacto diferencial de la fosforilación de la HSP90 en la ligación de PU-H71 y geldanamicina. Estos descubrimientos, que se persiguen adicionalmente, sugieren que los diversos inhibidores de HSP90 puede que estén afectados únicamente por las modificaciones posttraduccionales específicas de la chaperona. Tomadas conjuntamente, estas observaciones preliminares muestran que el PU-H71 reconoce una fracción de HSP90 que 50 está participando en un ciclo de chaperonas activas, y que esta característica no se comparte necesariamente con otros inhibidores de HSP90.

5.2. Inhibidores de HSP90 etiquetados para aplicaciones de diagnóstico y pronóstico.

Para medir en una manera de tumor por tumor la abundancia de la "HSP90 oncocénica", la descripción proporciona varias herramientas químicas (véanse las Secciones 5.2.1. y 5.2.2.) que se pueden usar para propósitos de diagnóstico y pronóstico. Adicionalmente, las herramientas químicas proporcionan nueva información sobre la heterogeneidad de la HSP90 asociada al tumor y emplean las características bioquímicas de un inhibidor de HSP90 particular para identificar la HSP90 específica de tumor que regula las vías biológicas y proteínas promotoras del tumor. Tales herramientas incluyen inhibidores de HSP90 etiquetados que identifican específicamente e interactúan con esta especie de "HSP90 oncocénica" tumoral, haciendo posible medir la abundancia de las especies "HSP90 oncocénicas" en diferentes subpoblaciones en los tumores y de esta manera, medir y predecir la sensibilidad de la terapia de inhibición del HSP90. Por otra parte, la medición de la abundancia de la "HSP90 oncocénica" proporciona

un medio para determinar si un tumor es dependiente de HSP90.

En un aspecto, la descripción proporciona un método para determinar si un tumor probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

- 5 (a) poner en contacto el tumor o una muestra que contiene células del tumor con un inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado que se liga de manera preferente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en un tumor o células tumorales;
- 10 (b) medir la cantidad del inhibidor de HSP90 etiquetado ligado al tumor o a las células tumorales en la muestra; y
- 15 (c) comparar la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado ligado al tumor o a las células tumorales en la muestra medida en la etapa (b) a una cantidad de referencia del inhibidor de HSP90 etiquetado ligado a las células normales;

donde una cantidad mayor de inhibidor de HSP90 etiquetado ligado al tumor o las células tumorales medido en la etapa (b) en comparación con la cantidad de referencia indica que el tumor probablemente responderá al inhibidor de HSP90.

15 El método implica medir en un tumor la abundancia de una especie de HSP90, la "HSP90 oncogénica", como un biomarcador para la terapia de HSP90. La abundancia de esta especie de HSP90 no se corresponde necesariamente con la expresión de la HSP90 total en el tumor. La descripción proporciona varias soluciones para medir la abundancia de la "HSP90 oncogénica". En tal modalidad, los derivados etiquetados de ciertos inhibidores de HSP90 se pueden usar como herramientas para medir su presencia y su abundancia.

20 Además, en este método particular mientras es mayor la relación de la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado ligado al tumor o a las células tumorales medido en la etapa (b) en comparación con la cantidad de referencia, es mayor la magnitud de la respuesta probable a la terapia de inhibidor de HSP90.

25 Todavía, además en este método particular mientras es mayor la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado ligado al tumor o a las células tumorales medidas en la etapa (a), es mayor la magnitud de la respuesta probable en la terapia del inhibidor de HSP90.

En una modalidad de este método particular, la cantidad de referencia del inhibidor de HSP90 etiquetado ligado a las células normales es la cantidad del inhibidor de HSP90 etiquetado ligado a las células normales en la muestra que contiene células del tumor.

30 En otra modalidad, la cantidad de referencia del inhibidor de HSP90 etiquetado ligado a las células normales es una cantidad predeterminada del inhibidor de HSP90 etiquetado ligado a las células normales en una muestra de referencia.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para determinar si un tumor probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

- 35 (a) poner en contacto el tumor o una muestra que contiene células del tumor con un inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado que se liga preferiblemente a una forma específica del tumor de la HSP90 presente en un tumor o células tumorales;
- 40 (b) medir la cantidad del inhibidor de HSP90 etiquetado ligado al tumor o a las células tumorales en la muestra; y
- 45 (c) comparar la cantidad del inhibidor de HSP90 etiquetado ligado al tumor o a las células tumorales en la muestra medida en la etapa (b) a una referencia;

en donde una cantidad mayor del inhibidor de HSP90 etiquetado ligado al tumor o a las células tumorales medido en la etapa (b) en comparación con la cantidad de referencia indica que el tumor probablemente responderá al inhibidor de HSP90.

45 En una modalidad de este método particular, la muestra de referencia son células cancerosas con nada a poca expresión de "HSP90 oncogénica". En otra modalidad la referencia es un compuesto correspondientemente etiquetado con poca o nada de ligación a la "HSP90 oncogénica".

El inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado se puede etiquetar con cualquier etiqueta detectable, y muchas de tales etiquetas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, el inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado puede ser fluorescentemente etiquetado, etiquetado con biotina, etiquetado con ANCA o radiactivamente etiquetado.

50 En la práctica de este método particular, el tumor puede ser cualquier tumor o formación biológica derivada del tumor que contenga la "HSP90 oncogénica", tales como exosomas. Por ejemplo, el tumor o las otras células o formaciones

biológicas derivadas del tumor que contienen la “HSP90 oncogénica” se puede asociar con, ser indicativa de, o derivada de cualquier cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de la tiroides, una leucemia que incluye leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloide crónica, leucemia linfoide, mieloma múltiple, carcinoma de células basales, melanoma, carcinoma de células renales, 5 cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, neuroblastoma, trastornos mieloproliferativos, cánceres gastrointestinales incluyendo tumores estromales gastrointestinales, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer anal, tumores cerebrales incluyendo gliomas, linfomas incluyendo linfoma folicular y linfoma de células B grande difuso, y cánceres ginecológicos incluyendo cánceres de ovario, 10 cervicales y de endometrio.

En la práctica de este método particular, el tumor, la célula tumoral o la célula asociada al tumor o formación biológica pueden estar presentes en un sujeto o se pueden aislar de un sujeto. De esta manera, el tumor, célula tumoral o célula asociada al tumor que se pondrá en contacto puede estar en la forma de un tumor sólido per se *in vivo* o en la forma de una célula unida tal como una muestra de tejido o como dentro de un tumor líquido o fluido 15 biológico; una muestra obtenida durante una extracción de sangre, aspirado de medula ósea, biopsia, una aspiración con aguja fina o un procedimiento quirúrgico; un fluido biológico; sangre o medula ósea. Las células que se ponen en contacto con el inhibidor de HSP90 etiquetado pueden estar presentes en cualquier forma incluyendo células alteradas, células vivas, células congeladas, células fijas y permeabilizadas, o células incrustadas en parafina fijadas con formalina.

20 El inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado puede ser una forma etiquetada del inhibidor de HSP90 que se va a administrar como terapia, o puede ser una forma etiquetada de un inhibidor de HSP90 diferente que incluye un inhibidor de HSP90 químicamente no relacionado o una forma etiquetada de un análogo, homólogo o derivado del inhibidor de HSP90 que se administra. Sujeto solamente al requisito de que el inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado y más probablemente el inhibidor de HSP90 no etiquetado al cual corresponde se liga de manera preferente a una forma específica del tumor en el HSP90 presente en muchos tumores y células tumorales. En este aspecto “de manera preferente” significa que el inhibidor de HSP90 se liga con sustancialmente mayor afinidad a la forma específica del tumor del HSP90 en comparación con la afinidad, si la hay, con la cual se liga a la característica 25 del HSP90 de las células normales o no de tumor.

Actualmente, un inhibidor de HSP90 considerado probablemente para ser administrado como terapia es PU-H71 o 30 un análogo, homólogo o derivado de PU-H71. Véanse por ejemplo, las Patentes de E.U.A. 7.820.658 B2; 7.834.181 B2; y 7.906.657 B2 para descripciones de inhibidores de HSP90 ilustrativos.

En una modalidad el inhibidor de HSP90 es PU-H71 y el inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado es una forma de PU-H71 o de un análogo, homólogo, o derivado de PU-H71. Ejemplos de formas de PU-H71 que pueden ser el inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado incluyen, pero no se limitan a, [¹²⁴I]-PU-H71, PU-H71-FITC2 o 35 PU-H71-NBD1, o un análogo biotinilado de PU-H71 tal como PU-H71-biotina-5, PU-H71-biotina-6, PU-H71-biotina-8 o PU-H71-biotina-9, que se describen a continuación.

Un derivado etiquetado de PU-H71, tal como [¹²⁴I]-PU-H71, [¹³¹I]-PU-H71, [¹²³I]-PU-H71, radioetiquetado, PU-H71 fluorescentemente etiquetado, PU-H71 etiquetado con biotina, o inhibidor etiquetado con ANCA por lo tanto se 40 puede emplear como una herramienta para identificar y cuantificar las especies de HSP90 específicas del tumor. La abundancia de esta especie de HSP90 tumoral se puede usar como un biomarcador predictivo de respuesta a la terapia de HSP90.

5.2.1. Sondas Fluorescentes, Biotiniladas y etiquetadas con ANCA para Detectar la HSP90 Oncogénica

La descripción proporciona sondas Biotiniladas, fluorescentemente etiquetadas y sondas etiquetadas con ANCA que 45 son capaces de detectar la HSP90 oncogénica en células cancerosas. La Sección 5.2.1.1. describe la producción de varios tipos de sondas para utilizarse de acuerdo con la presente descripción. La sección 5.2.1.2. describe el uso de tales sondas en los ensayos de pronóstico y de diagnóstico.

5.2.1.1. Producción de Sondas

La descripción proporciona inhibidores fluorescentemente etiquetados, biotinilados y etiquetados con ANCA que son 50 permeables a células y que se ligan selectivamente a “HSP90 oncogénica”. Los inhibidores permeables a células son capaces de penetrar la membrana celular de una célula y de ligarse a la HSP90 dentro del citoplasma de la célula. Para ser útil en los métodos de la invención, el inhibidor etiquetado tiene que penetrar las células en una cantidad que es medible por los métodos de detección conocidos por las personas expertas en la técnica. La sección 5.2.1.1.1. describe el desarrollo de diferentes sondas fluorescentemente etiquetadas que son permeables a células y son capaces de ligarse selectivamente a la “HSP90 oncogénica”. La sección 5.2.1.1.2. describe el desarrollo de 55 diferentes sondas Biotiniladas que son permeables a células y son capaces de ligarse selectivamente a la “HSP90 oncogénica”. La sección 5.2.1.1.3. describe el desarrollo de diferentes sondas etiquetadas con ANCA que son permeables a células y son capaces de ligarse selectivamente a “HSP90 oncogénica”.

5.2.1.1.1. Sondas Fluorescentemente Etiquetadas

Los inhibidores fluorescentemente etiquetados de HSP90 ya se han reportado, con análogos de geldanamicina (GM-FITC, GM-Bodipy,¹³ GM-cy3b¹⁴) así como pirazol **1** (análogo de fluoresceína, VER-00045864)¹⁵ usados como ligandos en los ensayos de polarización de fluorescencia (**Figura 8**). Un derivado de GM-FITC impermeable a células se usó para identificar la HSP90 de superficie celular por microscopía de fluorescencia¹⁶. La HSP90 sin embargo, es principalmente una proteína citoplasmática con expresión de superficie celular detectada solamente en ciertas células^{1,2}. Las sondas fluorescentes de esta manera son necesarias para analizar la HSP90 intracelular y de superficie celular.

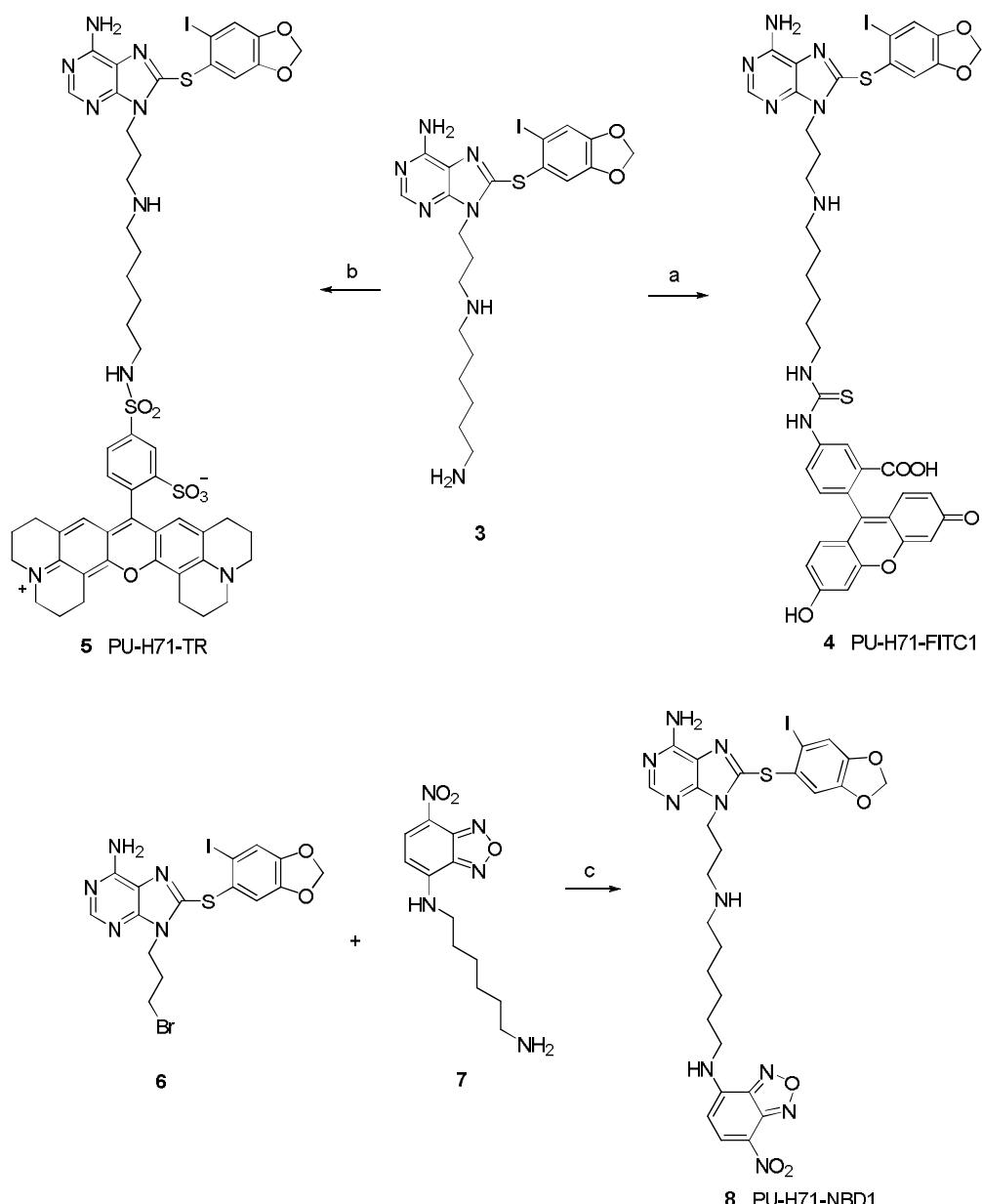
Una sonda permeable a células de HSP90 que interactúa específica y estrechamente con la “HSP90 oncogénica” es favorecida por las mediciones de citometría de flujo de este biomarcador potencial debido a que los métodos de fijación/permeabilización usados para la detección de antígenos intracelulares por citometría de flujo pueden dar por resultado la destrucción de los “complejos de HSP90 oncogénica” y de la morfología celular e inmunorreactividad superficial, las propiedades útiles en la citometría de flujo para la caracterización de células en las poblaciones heterogéneas. Para resolver este problema la descripción proporciona métodos para la síntesis, caracterización y valuación de los inhibidores de HSP90 fluorescentemente etiquetados que penetran las células vivas y se ligan al objetivo.

Esta descripción actual proporciona varios derivados fluorescentemente etiquetados nuevos de PU-H71 (**2**), un inhibidor de andamiaje de purina de HSP90 (**Figura 8**) y describe su aplicación biológica como sondas para estudiar la HSP90 por citometría de flujo activada por fluorescencia y microscopía de fluorescencia. Varios inhibidores de HSP90 basados en el andamiaje de purina, incluyendo BIIB021, MPC-3100, PU-H71 y Debio 0932 (anteriormente CUDC-305) están actualmente en el desarrollo clínico para cánceres^{18,19}.

Los ligandos fluorescentes para la proteína 90 de choque térmico (HSP90) se sintetizaron contenido ya sea isotiocianato de fluoresceína (FITC), 4-nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol (NBD) o el tinte de sulfurodamina 101 que cambia a rojo (Rojo Texas) conjugado a PU-H71 (**Figura 9**). Dos de los compuestos, PU-H71-FITC2 (**9**) y PU-H71-NBD1 (**8**), demostraron ser adecuados para la citometría de flujo activada por fluorescencia y microscopía de fluorescencia. De esta manera estas moléculas sirven como sondas útiles para estudiar la HSP90 en poblaciones de células vivas heterogéneas.

Para el desarrollo de ligandos pequeños etiquetados con tinte, la selección de un fluoróforo óptimo y su sitio de unión son relevantes. Particularmente en las moléculas pequeñas el tinte introducido puede afectar significativamente las características bioquímicas y farmacológicas del ligando. De acuerdo con la estructura de cristal de rayos X de PU-H71 (**2**) ligado a HSP90,²⁰ la cadena de N9-alquilamino del ligando se orienta hacia el solvente. Como resultado de esto, así como el SAR previo, varios de los compuestos sintetizados en la presente descripción contienen la etiqueta fluorescente unida a la posición N9. En modalidades particulares, como se describe a continuación, los derivados de PU-H71 con diferentes ligadores se etiquetaron con ya sea FITC, NBD o Rojo Texas (TR) (Véase la Figura 1).

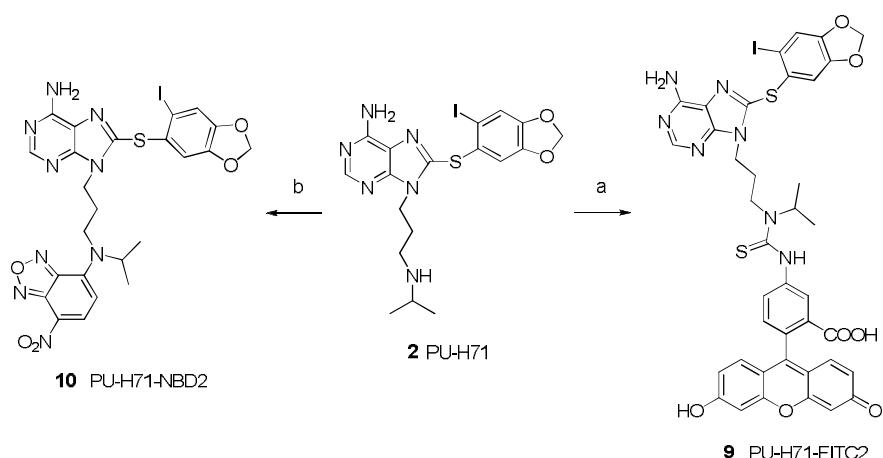
En una modalidad de la presente descripción, se unió un espaciador de seis carbonos a la amina constituyente de un inhibidor basado en el andamiaje de purina, proporcionando de esta manera el Compuesto **3** (Esquema 1 y **Figura 10**). Los inventores habían usado previamente este ligador para unir el PU-H71 al soporte sólido y mostró que el Compuesto **3** retiene una buena afinidad para la HSP90.²¹ Como se representa en el Esquema 1, el Compuesto **3** se hizo reaccionar con FITC en DMF/Et₃N para proporcionar el Compuesto **4** (PU-H71-FITC1) en un rendimiento de 40% después de la purificación por HPLC.



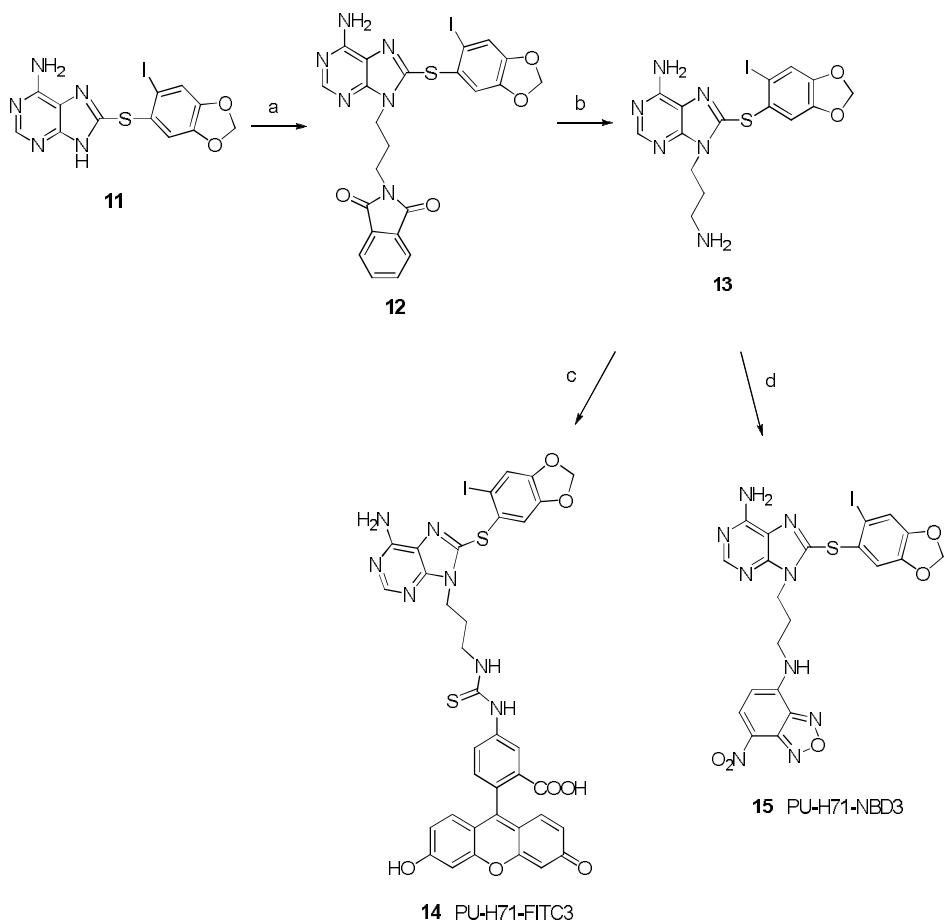
Esquema 1: Síntesis de PU-H71-FITC y PU-H71-NBD1

En otra modalidad, se sintetizó rojo Texas-PU-H71 (Compuesto 5; PU-H71-TR) por la reacción de 3 con cloruro de sulfonil sulfurodamina 101 en DMF para dar el Compuesto 5 en 61% de rendimiento después de la purificación por HPLC (**Esquema 1**). En el caso del análogo NBD, el bromuro 6 se hizo reaccionar con el Compuesto 7 en DMF para dar el Compuesto 8 (PU-H71-NBD1) en 47% de rendimiento (**Esquema 1**). El compuesto 6²¹ y el derivado NBD 7²² se prepararon como se describe previamente.

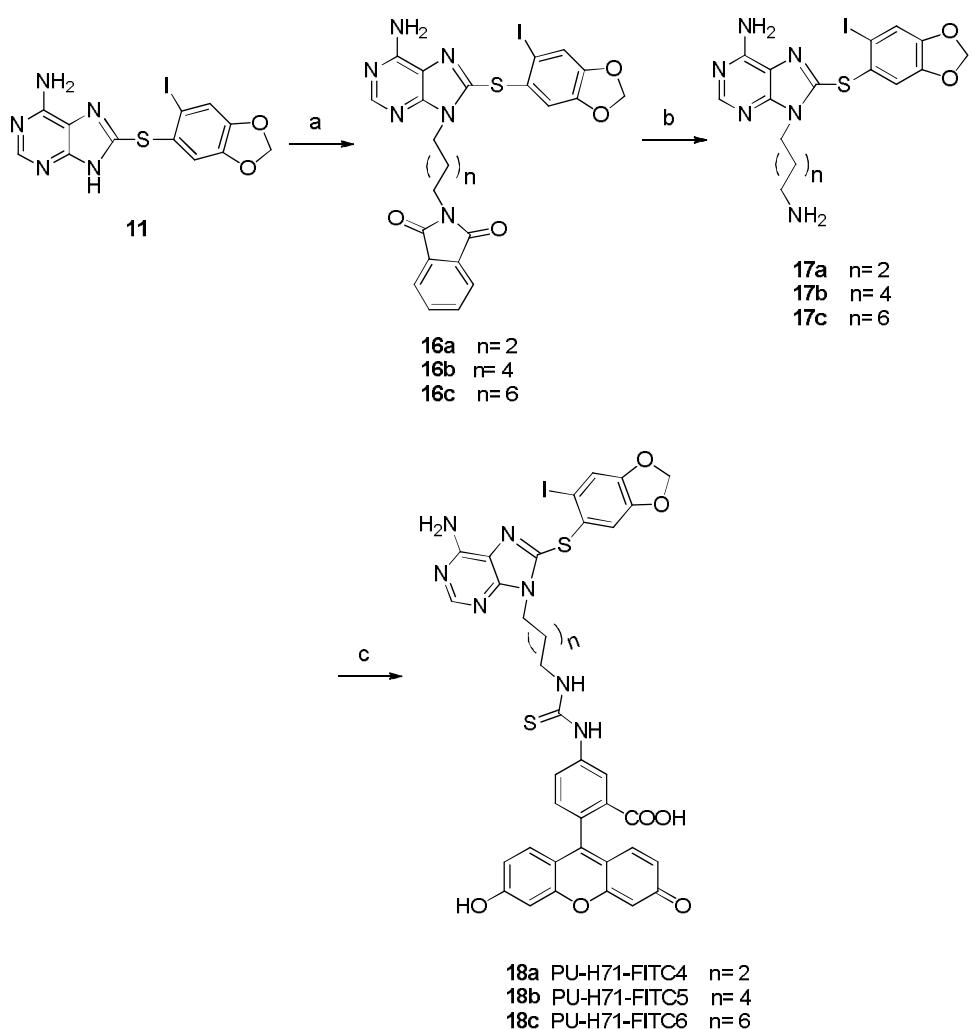
En otra modalidad, se ha tomado ventaja de la amina secundaria presente en PU-H71²³ y se hace reaccionar directamente con FITC o NBD-Cl para dar el Compuesto 9 (PU-H71-FITC2) (72%) o Compuesto 10 (PU-H71-NBD2) (40%), respectivamente (**Esquema 2** y **Figura 11**). Se formó la hipótesis de que el enlace del pigmento directamente a la amina debería resultar en análogos más permeables a la célula, debido a la presencia de la funcionalidad de amina ionizable. Adicionalmente, los derivados que contienen un grupo isopropilo (*por ejemplo*, Compuesto 9 y Compuesto 10) en lugar de un hidrógeno hacen los compuestos más lipofílicos y aumentan su permeabilidad celular.

**Esquema 2: Síntesis de PU-H71-FITC2 y PU-H71-NBD2**

Aún en otra modalidad, como se representa en el **Esquema 3 y Figura 12**, desisopropil-PU-H71 (Compuesto **13**) se hizo reaccionar con FITC o NBD-Cl para dar el Compuesto **14** (PU-H71-FITC3) (74%) o Compuesto **15** (PU-H71-NBD3) (42%), respectivamente. El compuesto **13** se sintetizó por N9-alquilación del Compuesto **11** con N-(3-bromopropil)-ftalimida y la eliminación posterior de ftalimida con hidrazina (**3**).

**Esquema 3: Síntesis de PU-H71-FITC3 y PU-H71-NBD3.**

Los compuestos adicionales análogos a PU-H71-FITC3 (mostrados en el **Esquema 3**) pero con diferentes longitudes del ligador se prepararon, como se representa en el **Esquema 4**.



Esquema 4: Síntesis de PU-H71-FITC4, PU-H71-FITC5, y PU-H71-FITC6

Los compuestos preparados en los Esquemas 1-4 se evaluaron por su capacidad para penetrar en células y enlazarse a HSP90 dentro de las células. Las sondas permeables celulares se favorecen debido a los métodos de fijación/permeabilización usados para la detección de antígenos intracelulares por citometría de flujo a menudo resultan en la destrucción de morfología celular e inmunoreactividad de superficie, propiedades útiles en la citometría de flujo para la caracterización de células en poblaciones heterogéneas. De esta manera, es de interés particular encontrar ligandos permeables a la célula que interactúa con el objetivo en células vivas sin el requerimiento de etapas de fijación y permeabilización.

- 10 Para investigar cuáles de los derivados PU-H71 fluorescentemente etiquetados sintetizados arriba retienen el perfil de permeabilidad celular del compuesto PU-H71 precursor, se ha examinado la permeabilidad celular de estas sondas HSP90 en líneas celulares de leucemia mielógena aguda (AML) humana, MV4-11 y MOLM-13. De los diez derivados fluorescentes de PU-H71 preparados en los **Esquemas 1-4**, se ha encontrado que PU-H71-FITC2 (**9**) y PU-H71-NBD1 (**8**) tienen la capacidad más alta de penetrar en células y enlazarse a HSP90 (**Figura 13**).
15 Específicamente, se ha mostrado la tinción eficiente de células vivas por estos dos derivados (**Figura 13A**) así como la actividad biológica en estas células indicativas de la inhibición objetivo (HSP90) (**Figuras 13B, 13C**). En particular, se ha mostrado que tanto PU-H71-FITC2 (**9**) como PU-H71-NBD1 (**8**) disminuyen la viabilidad de células MOLM-13 (**Figura 13B**), efecto asociado con la degradación de proteínas cliente HSP90 tales como FLT3 mutante y Raf-1 (**Figura 13C**) indicando inhibición de HSP90 intracelular en estas células cancerosas.¹⁻³
20 Adicionalmente, la microscopía de fluorescencia confocal de células de leucemia teñidas con PU-H71-FITC2 (**9**) mostró localización intracelular prominente (**Figura 14A**). En estos experimentos, DAPI se usó como un pigmento de viabilidad para discriminar entre las células viables y no viables. Este pigmento es impermeable en células vivas en la concentración probada, pero penetra en células no viables y se enlaza a regiones específicas de DNA. DAPI se excita en la mayoría de los instrumentos con un láser UV. Los datos similares se generaron con PU-H71-NBD1 (**8**)
25 (no se muestra).

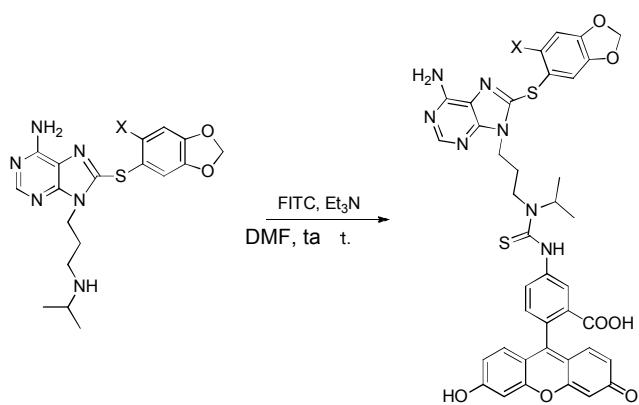
La citometría de flujo se usa comúnmente para separar y distinguir diferentes poblaciones celulares en

hematopoyesis normal y maligna por el uso de marcadores específicos. Como ejemplo, las células de blastocitos a menudo se cuantifican y caracterizan por tinción dim CD45 (CD45dim), en contraste con las poblaciones celulares no de blastocito circulantes, que están listas para la tinción CD45 (CD45hi).²⁴ Estas células, reguladas y separadas por la presencia de sus marcadores identificados, hemos mostrado aquí que también pueden teñirse para el objetivo,

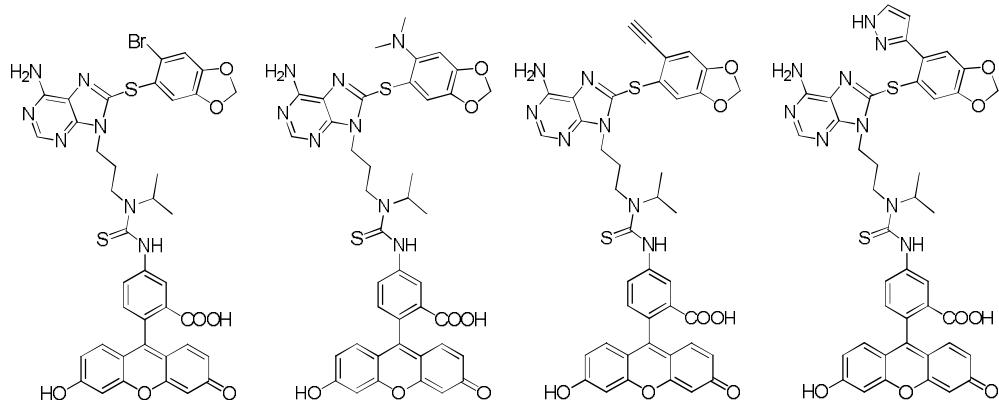
- 5 HSP90, con PU-H71-FITC2 (**Figura 14B**). De acuerdo con reportes previos que indican el enlace selectivo de PU-H71 a células tumorales HSP90,²³ PU-H71-FITC2 preferencialmente tiñó la célula maligna (blastocitos) y no la población celular normal (linfocitos) en una muestra de leucemia mieloide aguda primaria (**Figura 14B**).

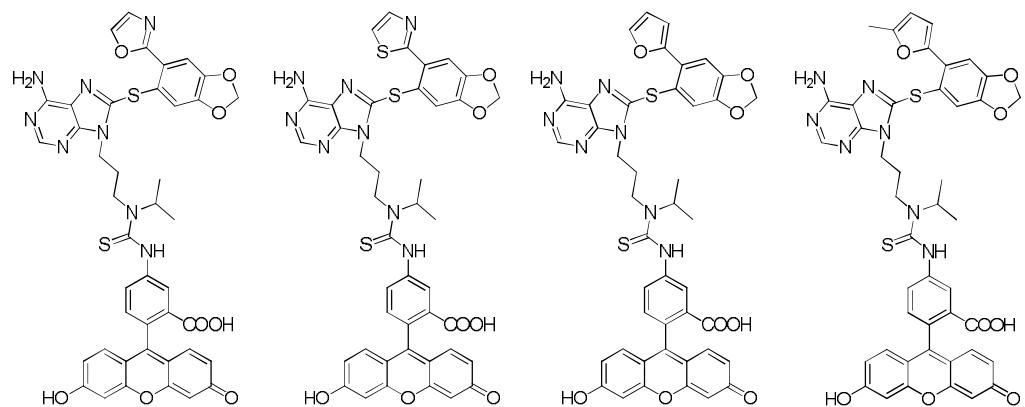
En consecuencia, mostramos que PU-H71-FITC2 (**9**) y PU-H71-NBD1 (**8**) penetra en células vivas y se enlaza al objetivo. Específicamente, mostramos que PU-H71-FITC2 y PU-H71-NBD1 tiñen células vivas (**Figura 13A**), reduce la viabilidad de las células de leucemia (**Figura 13B**), inhibe el HSP90 intracelular como se indica por la degradación de proteínas de cliente HSP90 (**Figura 13C**), se localizan intracelularmente como se indica por microscopía confocal (**Figura 14A**) y se enlanzan específicamente a HSP90 de tumor contra célula normal como se indican por citometría de flujo (**Figura 14B**), para proporcionar evidencia abundante de que estas sondas penetran en la célula y se enlanzan específicamente al objetivo de tumor HSP90, de igual forma a PU-H71. Los ejemplos tales como los 15 proporcionados en la **Figura 4**, **Figura 15**, **Figura 16** y **Figura 18** también demuestran que estos derivados fluorescentes de PU-H71 interactúan con la especie "HSP90 oncogénica" y además proporcionan un medio para cuantificar esta especie en un espectro grande de células cancerosas. Como se discute en la Sección 5.2.1.2., estos derivados fluorescentes de PU-H71 pueden aplicarse como sondas para citometría de flujo activada por fluorescencia o como herramientas para vigilar la interacción en tiempo real de HSP90 con el objetivo por 20 microscopía de fluorescencia.

Basado en los resultados discutidos arriba, diseñamos varias otras sondas permeables celulares que pueden interactuar con HSP90 y de esta manera, pueden usarse como herramientas de diagnóstico y/o pronóstico. En una modalidad, los compuestos similares a PU-H71-FITC2 pero con un sustituyente diferente en el anillo benzo[d][1,3]dioxol se sintetizaron en una manera similar a PU-H71-FITC2, como se muestra en el **Esquema 5**.

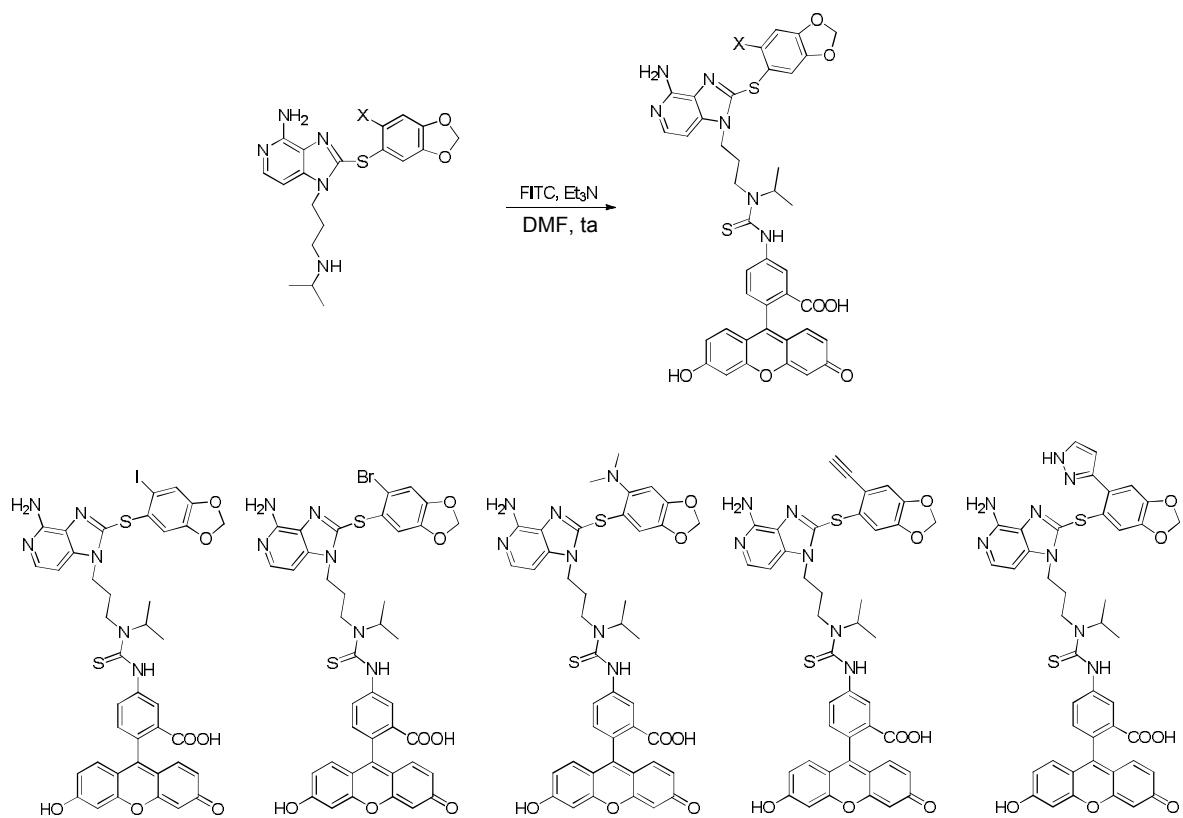


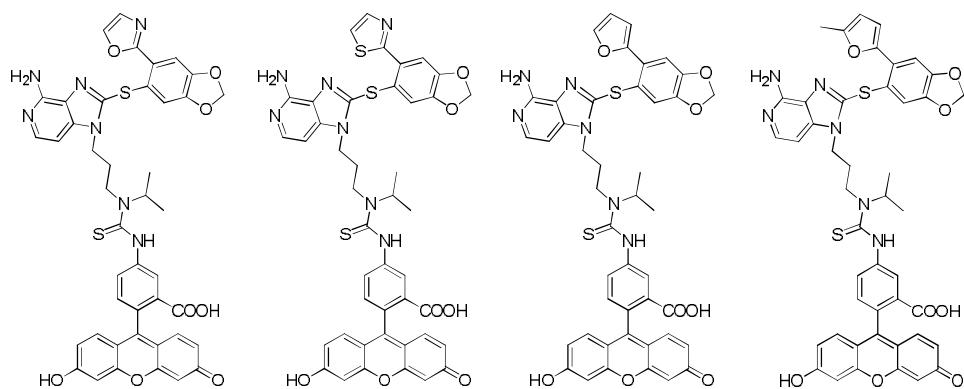
25



**Esquema 5: Síntesis de los Compuestos Análogos a PU-H71-FITC2**

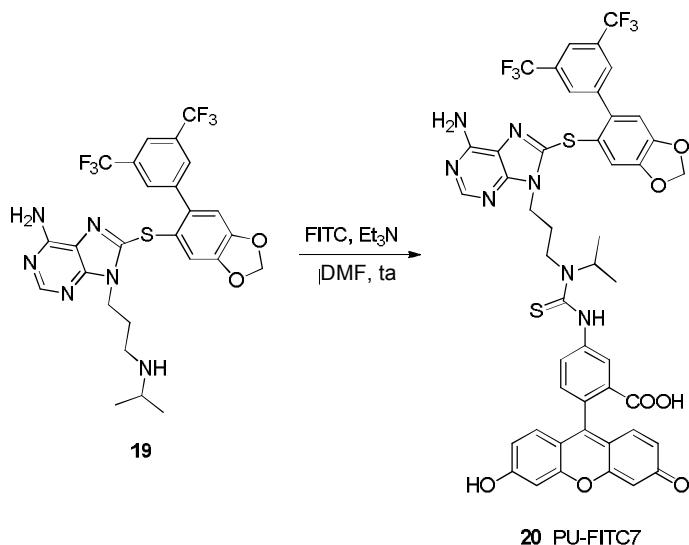
En otra modalidad, los compuestos similares a los compuestos representados en el **Esquema 5** pero donde el anillo de pirimidina en el andamiaje de purina se reemplaza con un anillo de piridina, se sintetizaron en una manera similar a PU-H71-FITC2, como se muestra en el **Esquema 6**.





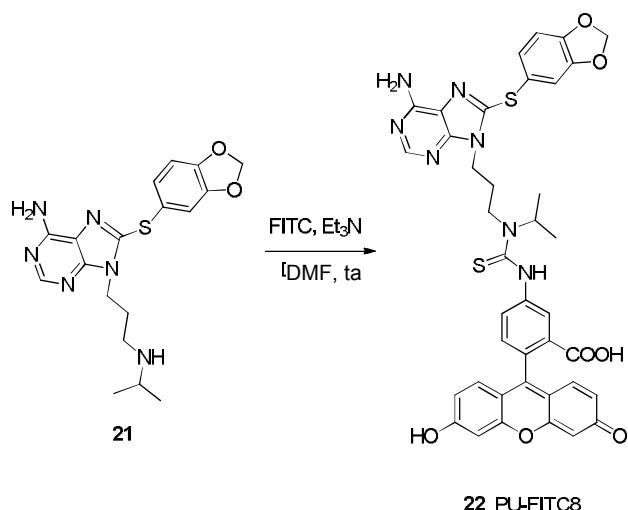
Esquema 6: Síntesis de Compuestos análogos a PU-H71-FITC2

En otra modalidad, el Compuesto PU-FITC7 se prepara, como se representa en el **Esquema 7**.



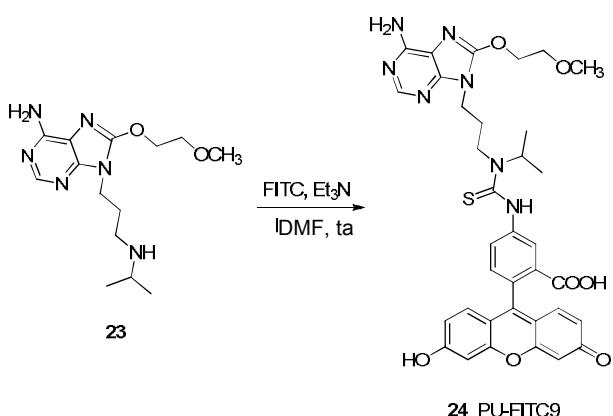
Esquema 7: Síntesis de PU-FITC7

En otra modalidad, el Compuesto PU-FITC8 se prepara, como se representa en el **Esquema 8**.

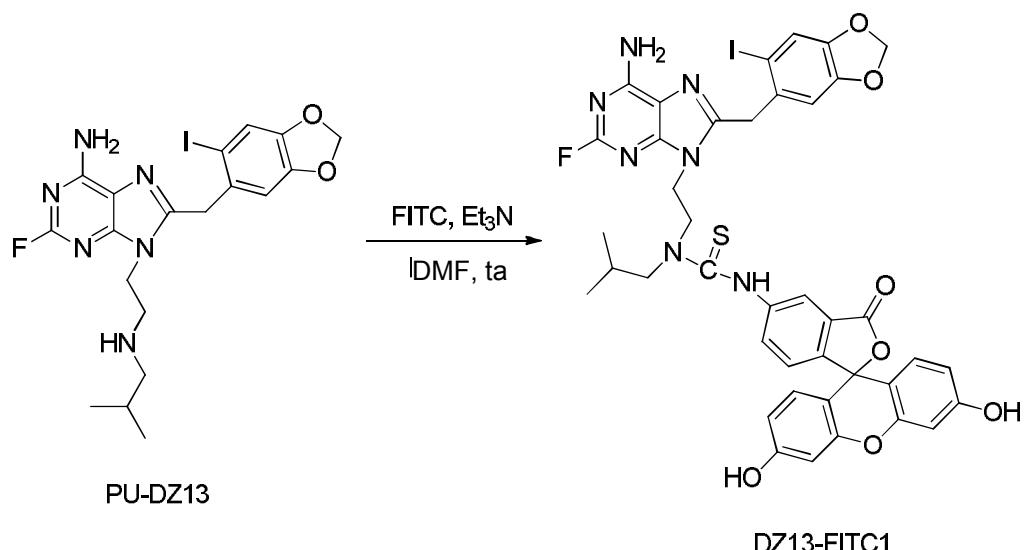


Esquema 8: Síntesis de PU-FITC8

En otra modalidad, el Compuesto PU-FITC9 se prepara, como se representa en el **Esquema 9**.

**Esquema 9: Síntesis de PU-FITC9**

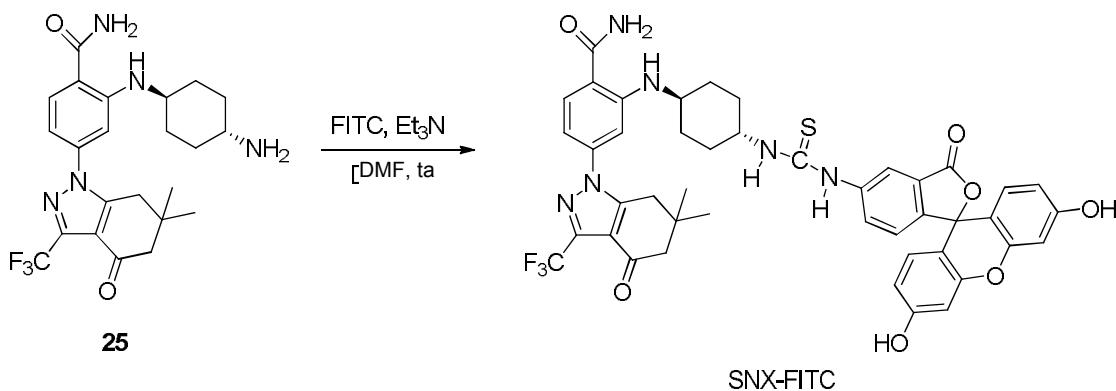
Todavía en otra modalidad, el Compuesto DZ13-FITC1 (PU-DZ13-FITC) se prepara, como se representa en el **Esquema 10**.



5

Esquema 10: Síntesis del Compuesto DZ13-FITC1

Todavía en otra modalidad, el Compuesto SNX-FITC se prepara, como se representa en el **Esquema 11**.

**Esquema 11: Síntesis del Compuesto SNX-FITC**

10 5.2.1.1.2. Síntesis de sondas biotiniladas para detectar HSP90 oncogénica (ejemplo comparativo)

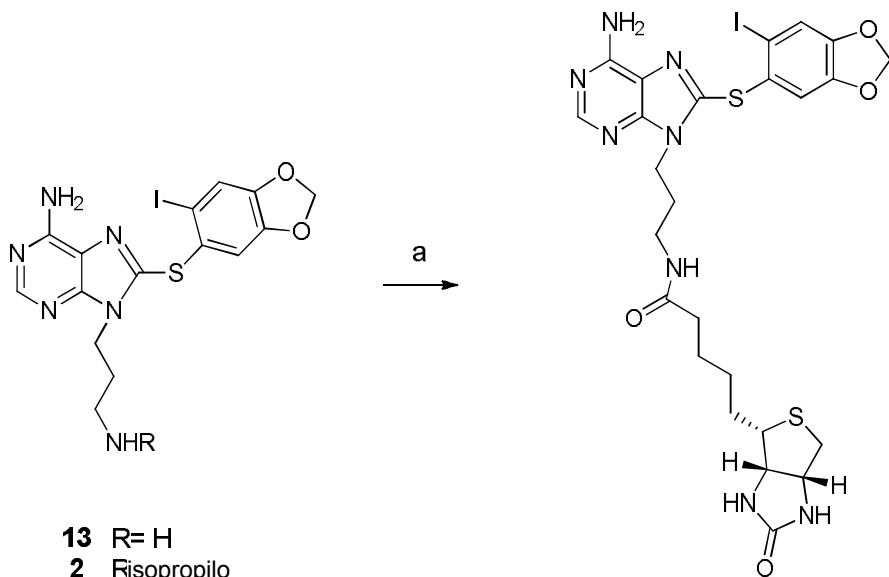
Una serie de análogos biotinilados de PU-H71 (**2**) y desisopropil-PU-H71 (**13**) se prepararon con el propósito de obtener compuestos que son capaces de penetrar en membranas celulares y enlazarse a HSP90 intracelular en

células vivas. Los inhibidores de HSP90 **13** y **2** se conjugaron a biotina a través de un ligador. El tipo de ligador, así como su longitud, se alteraron sistemáticamente con el fin de identificar compuestos capaces de penetrar en se en células vivas y el enlace a HSP90.

5 La etiqueta de biotina permite los experimentos de retención en soporte a través del enlace posterior a estreptavidina. El ligador debe ser de longitud suficiente para permitir el enlace concomitante a HSP90 y estreptavidina.

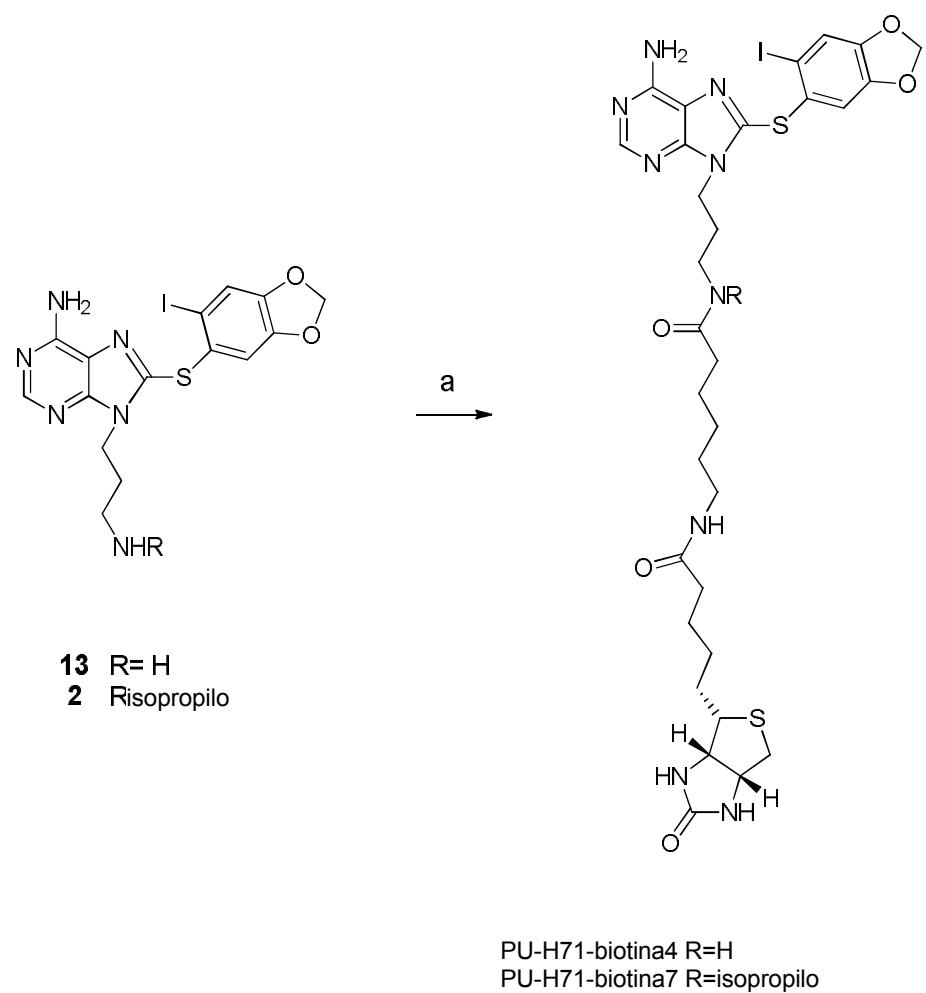
La etiqueta de biotina también permite detectar usando un anticuerpo de avidina o estreptavidina etiquetado, y de esta manera los inhibidores de HSP90 biotinilados pueden ser útiles en tejidos teñidos para detectar el "HSP90 oncogénica".

10 El Compuesto **13** y Compuesto **2** contienen una funcionalidad amina que permite la unión directa de biotina y ligadores que contienen biotina a través de la formación de un enlace amida. En una modalidad, las moléculas biotiniladas se prepararon sin ligador (esto es, unión directa a biotina). La síntesis de dos de tales compuestos, referidos como **PU-H71-biotina2** y **PU-H71-biotina3**, se representa en el **Esquema 12**. Los compuestos pueden prepararse del Compuesto **13** o Compuesto **2**, respectivamente, por acoplamiento DCC con D-biotina bajo sonicación.

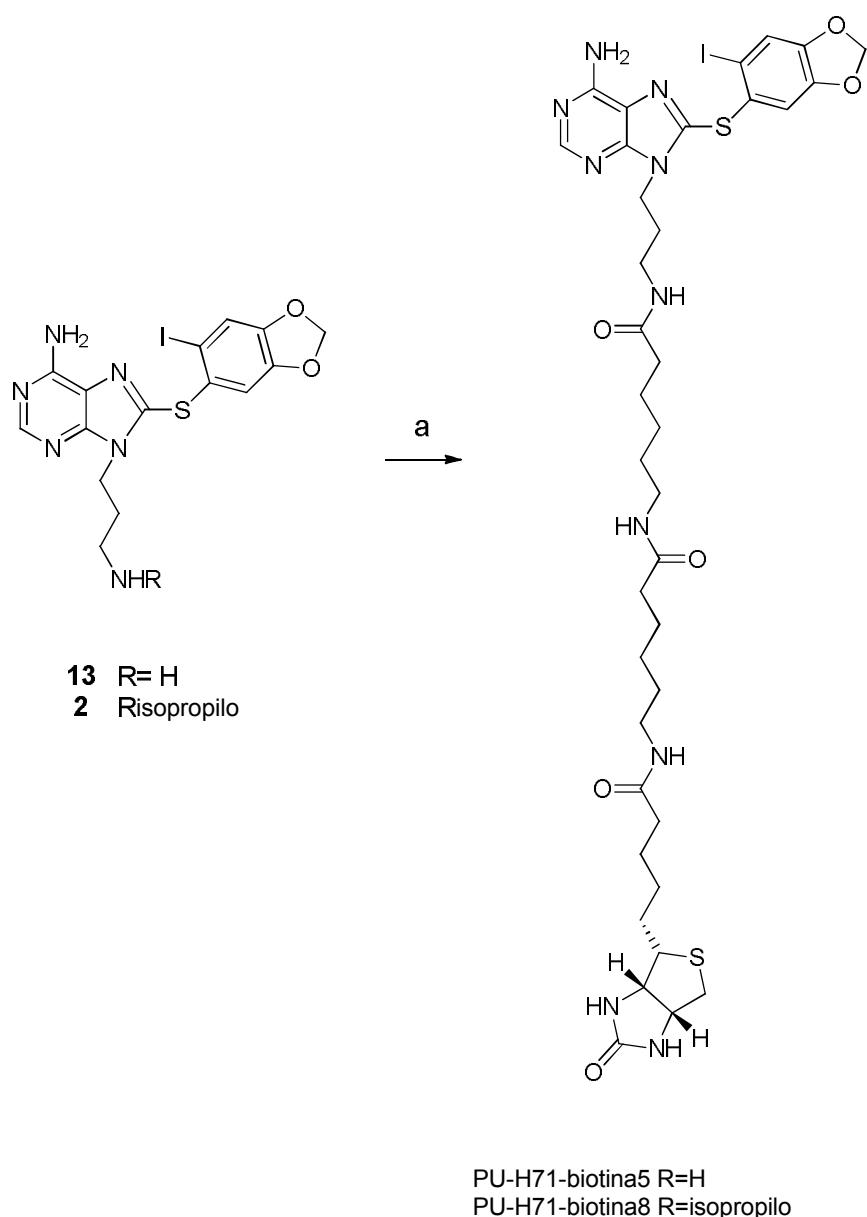


Esquema 12: Síntesis de PU-H71-biotina2 y PU-H71-biotina3

20 En otra modalidad, las moléculas biotiniladas se prepararon al unir covalentemente PU-H71 (**2**) o desisopropil-PU-H71 (**13**) a biotina a través de un grupo espaciador de cadena de 6 carbonos para producir **PU-H71-biotina4** o **PU-H71-biotina7**, como se representa en el **Esquema 13**. **PU-H71-biotina4** y **PU-H71-biotina7** pueden prepararse al hacer reaccionar el Compuesto **13** o Compuesto **2**, respectivamente, con el éster activo de N-hidroxisuccinimida comercialmente disponible que contiene la molécula de biotina a la que se hace referencia como NHS-LC-Biotina EZ-Link®, en la presencia de una base.

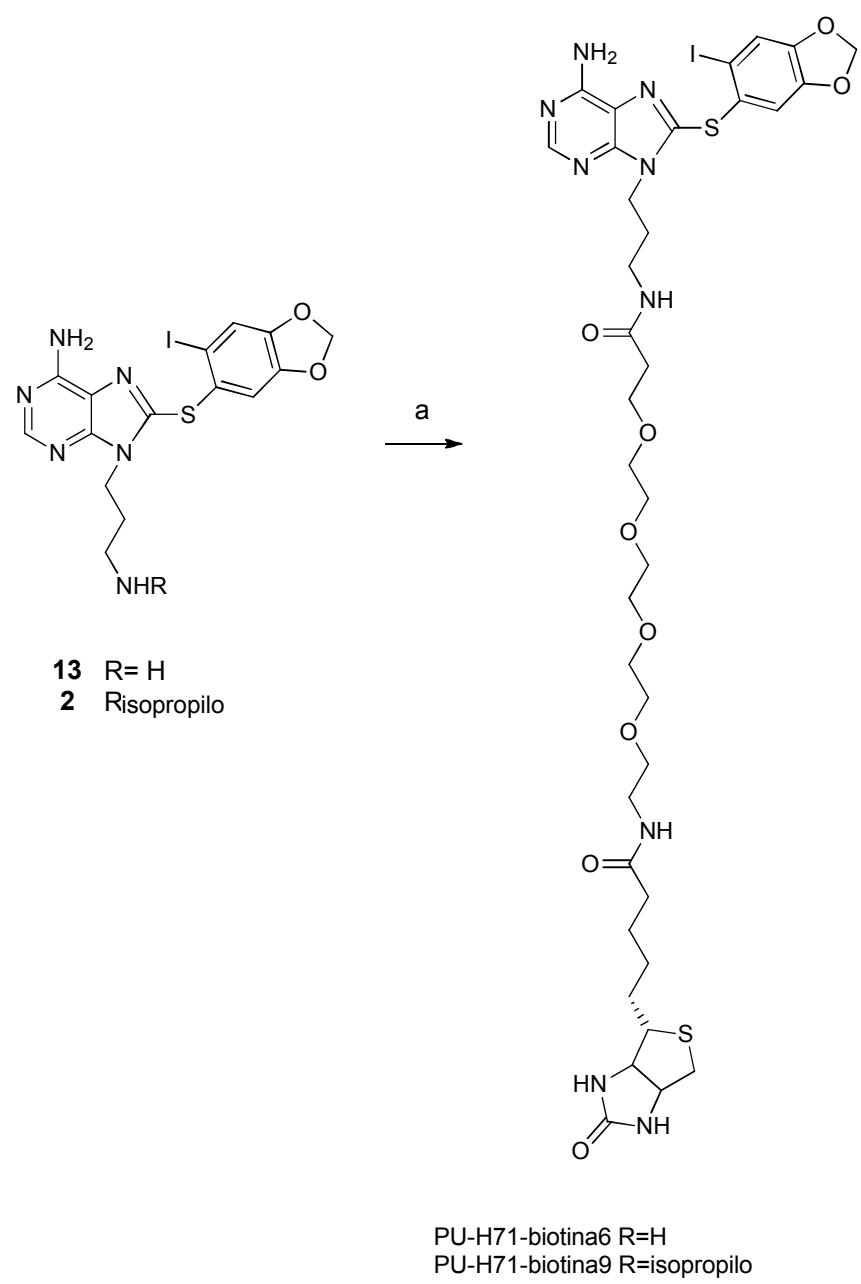
**Esquema 13:** Síntesis de PU-H71-biotina4 y PU-H71-biotina7

Todavía en otra modalidad, las moléculas biotiniladas se prepararon al unir covalentemente PU-H71 (**2**) o desisopropil-PU-H71 (**13**) a biotina a través de un grupo espaciador de cadena de carbono extendida para producir **PU-H71-biotina5** o **PU-H71-biotina8**, como se representa en el **Esquema 14**. La **PU-H71-biotina5** y **PU-H71-biotina8** pueden prepararse al hacer reaccionar el Compuesto **13** o Compuesto **2**, respectivamente, con el éster activo de N-hidroxisuccinimida comercialmente disponible que contiene la molécula de biotina a la que se hace referencia como NHS-LC-LC-Biotina EZ-Link®, en la presencia de una base.

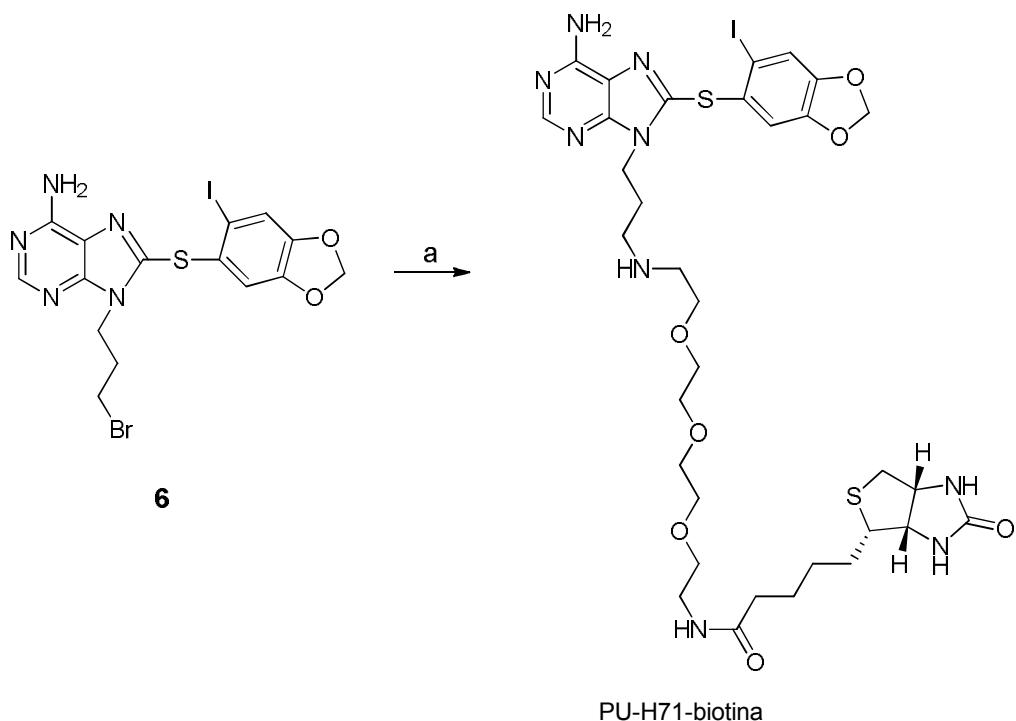


Esquema 14: Síntesis de PU-H71-biotina5 y PU-H71-biotina8

Aún en otra modalidad, las moléculas biotiniladas se prepararon al unir covalentemente PU-H71 (**2**) o desisopropil-PU-H71 (**13**) a biotina a través de una cadena de polietilenglicol para producir **PU-H71-biotina6** o **PU-H71-biotina9**, como se representa en el **Esquema 15**. La **PU-H71-biotina6** y **PU-H71-biotina9** pueden prepararse al hacer reaccionar el Compuesto **13** o Compuesto **2**, respectivamente, con el éster activo de N-hidroxisuccinimida comercialmente disponible que contiene la molécula de biotina a la que se hace referencia como NHS-PEG₄-Biotina EZ-Link®, en la presencia de una base.

**Esquema 15: Síntesis de PU-H71-biotina6 y PU-H71-biotina9**

Aún en otra modalidad representada en el **Esquema 16**, un análogo de biotina ligado a amina, al que se hace referencia como PU-H71-biotina, se sintetizó por la reacción del compuesto de bromuro **6** con Amina-PEO₃-Biotina EZ-Link®



Esquema 16: Síntesis de PU-H71-biotina

Para asegurarse de que los compuestos biotinilados todavía retienen afinidad para HSP90, cada uno se evaluó en un ensayo de polarización de fluorescencia usando lisado celular de cáncer SKBr3. Como puede apreciarse cada uno de los compuestos retiene una buena afinidad para HSP90 con IC_{50} en el intervalo de 31-154 nM (Tabla 1; PU-H71, $IC_{50} = 25$ nM).

5

Tabla 1. Propiedades de compuestos biotinilados

Compuesto	EC_{50} (nM); Ensayo de enlace SKBr3 HSP90	Enlace de HSP90-estreptavidina con células del lisado K562		PM	TPSA	ClogP
PU-H71	24.5	n.a.	n.a.	512	96.8	3.09
PU-H71-biotina	58.9	Sí	No	871.81	194.75	1.69
PU-H71-biotina2	153.5	No	No	738.66	146.24	3.12
PU-H71-biotina3	44.3	No	No	696.58	155.03	1.93
PU-H71-biotina4	34.8	No	No	809.74	184.13	3.49
PU-H71-biotina5	31.4	Sí	Sí	922.90	n.d	n.d.
PU-H71-biotina6	66.2	Sí	Sí	943.87	n.d.	n.d.
PU-H71-biotina7	72.8	No	No	851.82	n.d.	n.d.
PU-H71-biotina8	76.9	Sí	Sí	964.98	n.d.	n.d.
PU-H71-biotina9	110.1	Sí	Sí	985.95	n.d.	n.d.

n.a.= no aplicable

10 n.d.= no determinado; los valores TPSA y Clog P se determinaron con Chemdraw y n.d. indica que no fue posible determinar un valor para la estructura dada.

Dos tendencias generales pueden observarse. Primero, comparado con análogos de PU-H71 los análogos de desisopropilo se enlanzan de promedio con aproximadamente una afinidad dos veces mayor (esto es PU-H71-

biotina3 contra **2**, **4** contra **7**, **5** contra **8**, **6** contra **9**). Segundo, en términos de los ligadores la serie de carbono es más potente que la serie de etilenglicol (esto es **PU-H71-biotina4** y **5** contra **6**, **7** y **8** contra **9**). En resumen, todos los compuestos preparados mantienen buena afinidad con HSP90 y fueron adecuados para análisis adicional.

Habiendo mostrado que cada una de las moléculas biotiniladas preparadas mantiene buena afinidad para HSP90 se desea determinar después si la longitud de cadena fue suficiente para mantener el enlace concomitante a HSP90 y estreptavidina. Se trató el lisado K562 (500 µg de proteína) durante la noche con una mezcla de perlas de estreptavidina y 100 µM de cada uno de los compuestos. Después del lavado suficiente para remover cualquier material sin enlace, el peletizado de perla restante se analizó por SDS-PAGE. El gel se lavó y tiñó con azul coomasie durante 1 h.

PU-H71-biotina-5, **6**, **8**, **9** así como **PU-H71-biotina** muestran una banda en aproximadamente 90 kDa, indicando el enlace concomitante a HSP90 y estreptavidina. Los análogos sin un ligador (**PU-H71-biotina2** y **3**) y con un grupo espaciador de 6 carbonos (**PU-H71-biotina4** y **7**) no mostraron una banda de 90 kDa, indicando que el ligador fue demasiado corto. En contraste, los compuestos que contienen un grupo espaciador de cadena de carbono extendida (**PU-H71-biotina5** y **8** y una cadena de polietileno (**PU-H71-biotina6** y **9**) fueron de longitud suficiente para permitir el enlace concomitante.

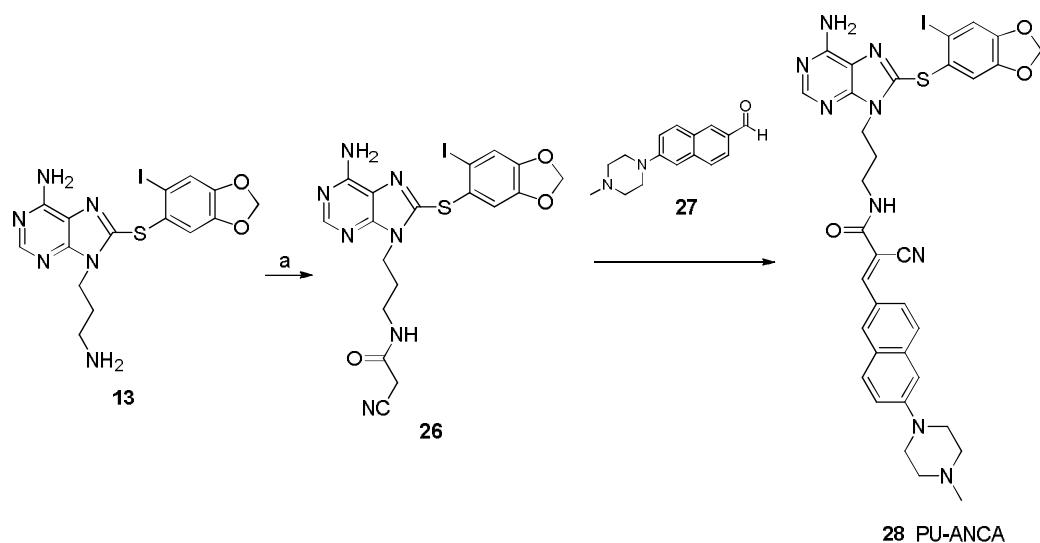
Habiendo mostrado que algunas de las moléculas se enlazan concomitantemente a HSP90 y estreptavidina, después investigamos si esto puede similarmente realizarse en células vivas. En este caso, el enlace en las células K562 se determinó primero por tratamiento con 100 µM de **PU-H71-biotina-5**, **6**, **8**, **9** así como **PU-H71-biotina** durante 4 h luego se analizó por SDS-PAGE. De los compuestos evaluados únicamente **PU-H71-biotina** no mantuvo el enlace en células vivas. De manera interesante, **PU-H71-biotina** contiene una amina ionizable que limita su permeabilidad y puede ser un factor primario para su incapacidad de enlazarse. En contraste, **PU-H71-biotina-5**, **6**, **8**, **9** no contienen una amina ionizable y son capaces de penetrar en la membrana celular. Los compuestos activos se evaluaron en 50, 25, y 10 µM y muestran que **PU-H71-biotina-6** y **9** mantienen buen enlace aún en 10 µM. Estos dos compuestos se evaluaron además en 5, 2.5 y 1 µM y aún en la concentración más baja todavía se presenta una banda débil en aproximadamente 90 kDa. **PU-H71-biotina-6** todavía muestra una banda débil en 0.5 µM, indicando que el enlace concomitante todavía se mantiene en esta concentración baja.

Parece que los compuestos que contienen grupos espaciadores de cadena de carbono extendidos (**PU-H71-biotina-5**, **8**) o ligadores de cadena de polietilenglicol (**PU-H71-biotina-6**, **9**), independientemente de si **13** o **2** se une, son capaces de penetrar en la membrana de células K562, enlazarse a HSP90 y posteriormente enlazarse a las perlas de estreptavidina. Adicionalmente, parece que los compuestos que contienen ligadores de cadena de polietilenglicol (**PU-H71-biotina-6**, **9**) pueden preferirse.

5.2.1.1.3. Síntesis de sondas etiquetadas con ANCA

La presente descripción proporciona además sondas para detectar HSP90 oncogénica al etiquetar inhibidores con amino naftalenil-2-ciano-acrilato (ANCA). El ANCA es una sonda fluorescente que puede enlazarse a y teñir placas amiloideas en tejido humano. Al ANCA a menudo se hace referencia como un rotor molecular. Los rotores moleculares son sondas donde el rendimiento cuántico de fluorescencia es dependiente del ambiente que lo rodea. La porción estructural del rotor molecular es tal que cuando se trae en proximidad cercana de una macromolécula la rotación molecular interna se obstaculiza (incremento en rigidez) resultando en un cambio en la emisión de fluorescencia, es decir, los rotores moleculares enlazados y no enlazados tienen diferentes picos de emisión de fluorescencia (ver **Figura 15**). Este aspecto físico puede explotarse cuando se conjuga con PU-H71, que tiene especificidad por la "HSP90 oncogénica". El rotor molecular conjugado para PU-H71 le permite a uno discernir en una población heterogénea de células cancerosas, las células con "HSP90 oncogénica" y permite la cuantificación de tal especie en las células presentes en especímenes obtenidos de intervenciones tales como biopsia, cirugía o aspirados por aguja fina.

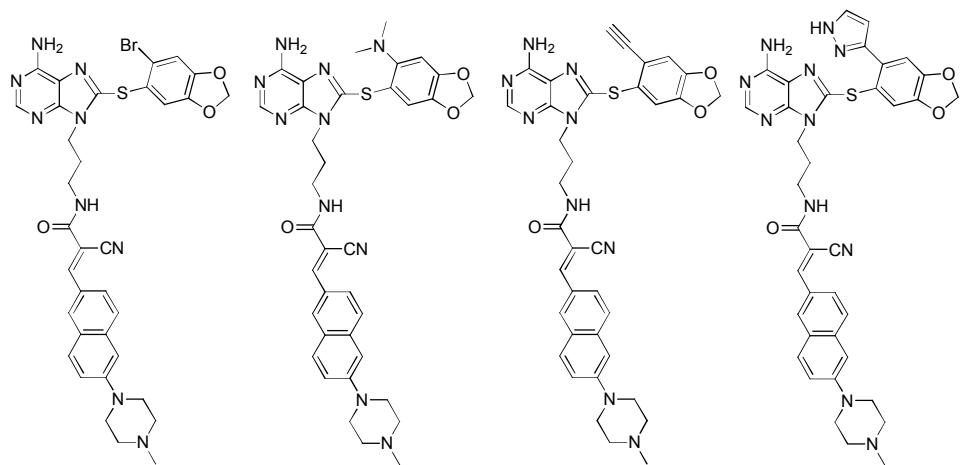
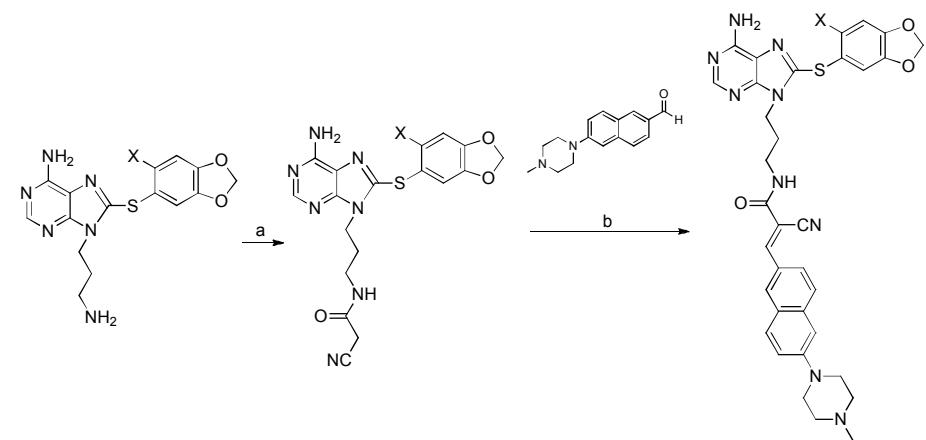
En una modalidad, el desisopropil-PU-H71 (**13**), PU-H71 (**2**) o análogos de los compuestos de **13** o **2** pueden etiquetarse con ANCA, como se representa en el **Esquema 17**. En el **Esquema 17**, desisopropil-PU-H71 (**13**) se hace reaccionar con ácido cianoacético para producir el Compuesto **26**. En la siguiente etapa, el Compuesto **26** se hace reaccionar con el Compuesto **27** a temperatura elevada para proporcionar el Compuesto **28** (**PU-ANCA**).

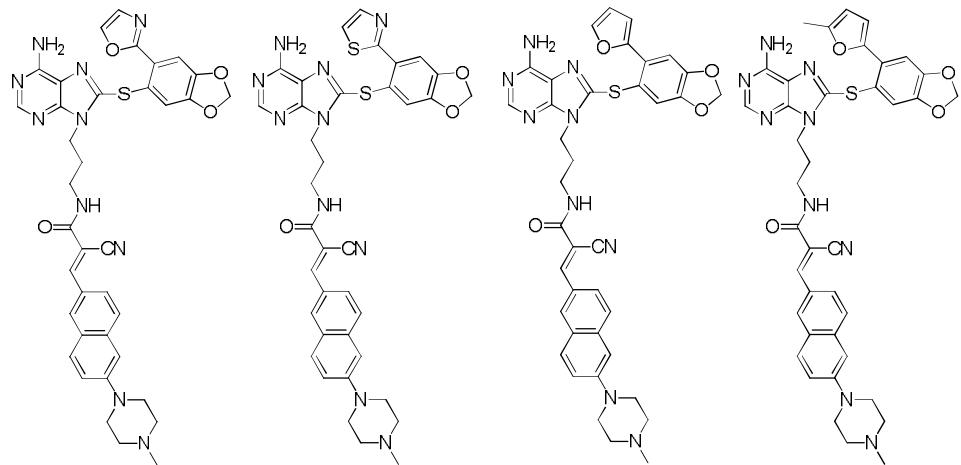


28 PU-ANCA

Esquema 17: Síntesis de PU-ANCA

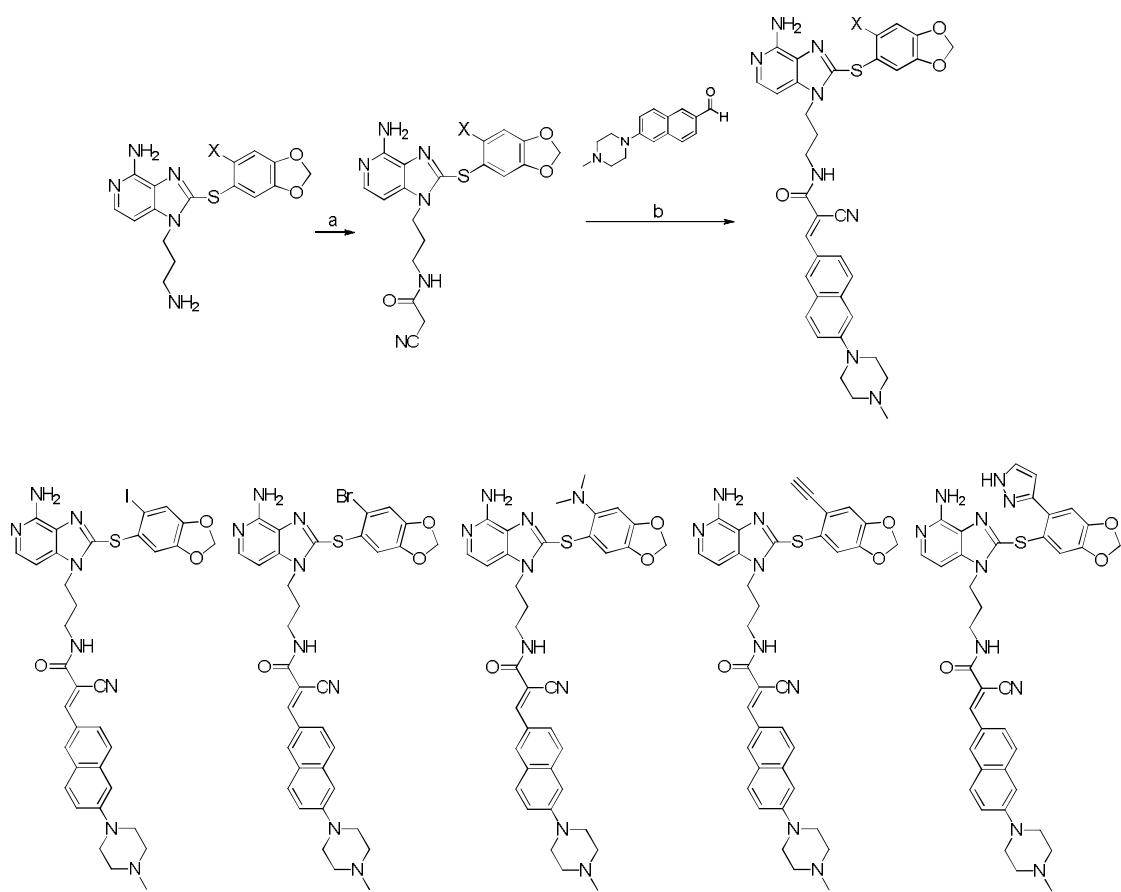
Aún en otra modalidad, los inhibidores de HSP90 etiquetados con ANCA útiles en los métodos descritos, tales como aquellos basados en purina se muestran en el **Esquema 18**.

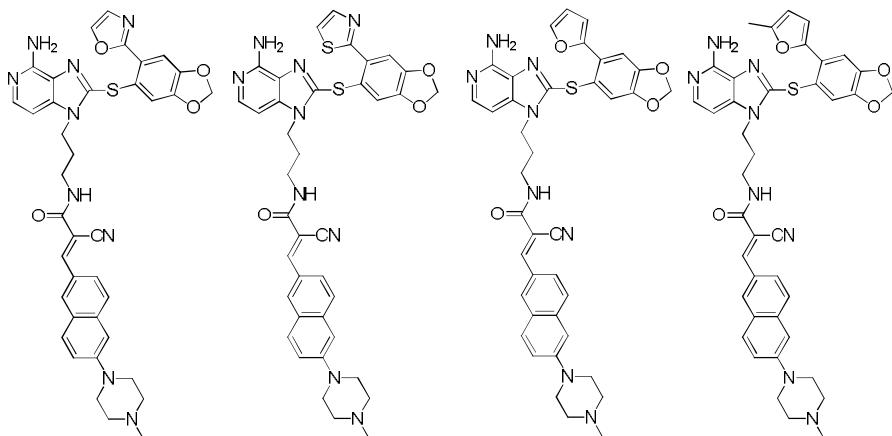




Esquema 18: Síntesis de inhibidores de HSP90 etiquetados con ANCA basados en purina

Aún en otra modalidad, los inhibidores de HSP90 etiquetados con ANCA útiles en los métodos descritos, tales como aquellos basados en imidazopiridina se muestran en el **Esquema 19**.





Esquema 19: Síntesis de inhibidores de HSP90 etiquetados con ANCA basados en imidazopiridina

5.2.1.2. Utilización de sondas en el pronóstico y tratamiento del cáncer

5.2.1.2.1. Malignidades hepáticas

5 Los estudios discutidos en la Sección 5.1, confirman que ciertos inhibidores de HSP90 se enlazan preferencialmente a un subconjunto de especies HSP90, el “HSP90 oncogénica” que es más abundante en células cancerosas que en células normal. La abundancia de esta especie no se dicta únicamente por la cantidad de expresión HSP90 y es predictivo de la sensibilidad celular para la inhibición de HSP90. De esta manera, determinar la proporción de la población HSP90 en las células cancerosas del paciente que está disponible para el enlace a un inhibidor etiquetado que se selecciona para este “HSP90 oncogénica”, tal como PU-H71, predice la sensibilidad para inhibidores de HSP90 en la clínica y revela el nivel en el cual las células cancerosas son dependientes de HSP90.

10 Específicamente, la descripción muestra que los inhibidores de HSP90 fluorescentemente etiquetados permeables en las células tales como derivados de PU-H71-FITC (*por ejemplo*, PU-FITC; PU-H71-FITC2) etiquetan células vivas tan pronto como una hora después de la exposición, reduce la viabilidad de las células de leucemia a las 24-48h, inhibe el HSP90 de tumor intracelular como se indica por degradación de oncoproteínas cliente HSP90, se localizan intracelularmente como se indica por microscopía confocal y se enlazan específicamente a HSP90 de célula normal contra tumoral como se indica por citometría de flujo. Adicionalmente, los compuestos fluorescentemente etiquetados de la presente descripción se enlazan a la especie de “HSP90 oncogénica”, que proporciona evidencia amplia de que esta sonda penetra en la célula y se enlaza específicamente al objetivo de tumor “HSP90 oncogénica”, de forma similar a PU-H71.

15 Los métodos de la presente descripción pueden usarse para determinar si un paciente con una malignidad hematológica (*por ejemplo*, leucemia) o un trastorno mieloproliferativo responderá a la terapia de inhibición de HSP90. El método puede aplicarse a diferentes malignidades hepáticas incluyendo, pero no limitadas a, leucemia incluyendo leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloide crónica, a leucemias 20 de linfoide, a mieloma múltiple y neoplasias y trastornos mieloproliferativos.

25 La descripción proporciona un método para determinar si un paciente con un cáncer en la sangre probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende poner en contacto una muestra que contiene células cancerosas y células no cancerosas (*por ejemplo*, linfocitos) del paciente con un inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado permeable a la célula que se enlaza preferencialmente a una forma específica del tumor de HSP90 presente en las células cancerosas del paciente, medir la cantidad de inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas y células no cancerosas en la muestra, y comparar la cantidad del inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas con la cantidad del inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células no cancerosas, en donde una cantidad mayor de inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas que a las células no cancerosas indica que el tumor probablemente responderá al inhibidor de HSP90. En ciertas modalidades, la cantidad del enlace al inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado permeable a la célula se determina usando citometría de flujo.

30 En algunas modalidades, una relación de enlace de células sanguíneas cancerosas respecto a los linfocitos normales de alrededor de 1.5 o mayor indica que un paciente con cáncer será susceptible a la terapia de inhibición de HSP90. En otras modalidades, una relación de enlace de células sanguíneas cancerosas respecto a los linfocitos normales de alrededor de 2 o mayor indica que un paciente con cáncer será susceptible a la terapia de inhibición de HSP90. Todavía en otras modalidades, una relación de enlace de células sanguíneas cancerosas respecto a los linfocitos normales de alrededor de 2.5 o mayor indica que un paciente con cáncer será susceptible a la terapia de

inhibición de HSP90. Todavía en otras modalidades, una relación de enlace de células sanguíneas cancerosas respecto a los linfocitos normales de alrededor de 3 o mayor indica que un paciente con cáncer será susceptible a la terapia de inhibición de HSP90. Todavía en otras modalidades, una relación de enlace de células sanguíneas cancerosas respecto a los a linfocitos normales de alrededor de 4 o mayor indica que un paciente con cáncer será susceptible a la terapia de inhibición de HSP90. Todavía en otras modalidades, una relación de enlace de células sanguíneas cancerosas respecto a los linfocitos normales de alrededor de 5 o mayor indica que un paciente con cáncer será susceptible a la terapia de inhibición de HSP90.

Un número grande de líneas celulares establecidas y muestras de tumor primarias se investigaron al realizar un análisis correlativo entre el enlace de un inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado permeable a la célula (*por ejemplo*, PUH71-FITC2) y la viabilidad celular *in vitro* durante la exposición a los inhibidores de HSP90. Para determinar el enlace PUH71-FITC2 a un panel de las líneas celulares y muestras de leucemia primarias, usamos un análisis de citometría de flujo de parámetro múltiple. También probamos la sensibilidad de estas células con inhibidores de HSP90 al realizar ensayos de viabilidad 48h después de la exposición al fármaco.

La citometría de flujo activada por fluorescencia, sigue siendo un método de elección para enumerar, purificar y analizar células.^{9,10} De hecho, una multitud de mediciones puede realizarse ahora por citometría de flujo, y los avances técnicos recientes permiten que estas mediciones se hagan simultáneamente en células individuales dentro de poblaciones heterogéneas.¹¹ Tal análisis de parámetro múltiple es bastante potente ya que proporciona más datos de menos muestra, una consideración clave cuando se limitan las muestras de pacientes. El análisis de parámetro múltiple también permite una identificación más exacta de las poblaciones, al excluir células indeseadas que se enlanzan a algunos reactivos.^{9,10} El método de esta manera es óptimo para analizar el enlace de los ligandos HSP90, cuando se etiqueta fluorescentemente, para distinguir las poblaciones celulares.

Los ligandos fluorescentemente etiquetados han tenido históricamente una variedad amplia de usos en biología y farmacología,¹² y ofrecen la ventaja de mantener las propiedades farmacológicas del ligando no etiquetado. Además de las investigaciones *in vitro* de enlace al receptor del ligando, las sondas fluorescentes de molécula pequeña permiten el monitoreo en tiempo real y no invasivo de la interacción entre el objetivo y el ligando en poblaciones celulares vivas, tales como por medio de citometría de flujo.

Los pigmentos fluorescentes absorben luz en ciertas longitudes de onda y a su vez emiten su energía de fluorescencia a una longitud de onda superior. Cada pigmento tiene un espectro de emisión distinto, que puede explotarse para análisis multicolor por citometría de flujo. Entre los más usados están el isotiocianato de fluoresceína (FITC), 4-nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol (NBD) o el pigmento sulfurodamina 101 que cambia a rojo (Rojo Texas). FITC y NBD se detectan en el canal FL1 en la mayoría de los instrumentos y también son una buena elección para la microscopía de fluorescencia (excitación 495 y 466 nM y emisión 519 y 539 nM, respectivamente), mientras que el Rojo Texas se detecta en FL3 en instrumentos láser sencillos (excitación 589 nM y emisión 615 nM).

En la Sección 5.1.1., se discuten estudios con diversas células de leucemia primarias y células de sangre normal. En particular, analizamos muestras de CML de fase de blastocito y crónico primario y leucemia mieloide aguda (AML) que contienen tanto blastocitos (población de células malignas) como linfocitos (población de células normales), células CD34+ aisladas de la sangre del cordón de donadores saludables, células mononucleares totales de sangre periférica y también leucocitos de sangre periférica (PBLs) (**Figuras 1c-e, 3, 4**). Se ha usado una fluoresceína etiquetada PU-H71 (PUH71-FITC2) como una herramienta para realizar un análisis citométrico de flujo de parámetro múltiple, en poblaciones celulares heterogéneas. Como se muestra en la **Figura 4a**, una estrategia de regulación se usa para distinguir entre la población celular normal (linfocitos) y la población celular maligna (blastocitos). Los blots de punto de citometría de flujo se muestran para tres pacientes diferentes. En la **Figura 4b**, se muestra la relación del enlace de PU-H71-FITC2 a HSP90 en blastocitos de CML respecto a los linfocitos normales de las muestras de pacientes primarias.

En la **Figura 4d**, la citometría de flujo se usa de nuevo para distinguir entre los blastocitos y linfocitos normales y para analizar el enlace de células CD34+ dentro de la ventana de blastocitos. En la **Figura 4e y 4g**, se determinó la relación del enlace de PU-H71-FITC2 a blastocitos HSP90 CD34+ respecto a los linfocitos normales en seis pacientes de leucemia y en tres pacientes saludables. Los nueve pacientes se trataron con ya sea PU-H71-FITC2 o un control (TEG-FITC) (**Figura 4f y 4h**). Como se muestra en la **Figura 4h**, los pacientes que tuvieron la relación más alta (referidos como CML03106, 0614 y 0124; relaciones promedio en la **Figura 4g** como “bcCML”) fueron más sensibles que aquellos con una relación inferior (referidos como CML0118, 0128 y 0222; relaciones promedio en la **Figura 4g** como “cpCML”). Se señala que los pacientes saludables tienen una relación cerca de uno (**Figura 4g**) y sus células en la sangre del cordón umbilical no fueron significativamente sensibles a PU-H71 (**Figura 4h**, referidos como CB1,2,3). Los resultados exhibidos en la **Figura 4f** indican que la viabilidad de los blastocitos CD34+ se redujo significativamente en los pacientes mientras que no se vieron afectados los linfocitos normales. Similarmente, el compuesto de control (TEG-FITC) no redujo la viabilidad de ya sea los blastocitos CD34+ o los linfocitos normales.

En muestras primarias, analizamos tanto las poblaciones de blastocito y linfocitos normales en el mismo paciente. Se ha encontrado que en un panel que comprende células de leucemia primarias (muestras de leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML) de fase de blastocito y crónica primarias), y células de sangre saludable (incluyendo células de sangre del cordón umbilical CD34+, y células mononucleares de sangre periférica

total aisladas de donadores saludables), células con la avidez más alta para PUH71-FITC2 también fueron las más sensibles a ser exterminadas por este agente (**Figura 16**). De manera importante, los linfocitos normales presentes dentro de las muestras de sangre con leucemia, muestran un enlace bajo a PU-FITC y no se vieron afectadas por PU-H71. De esta manera, racionalizamos que el uso del enlace relativo de PU-FITC en células de leucemia comparadas con linfocitos normales dentro del mismo paciente pueden usarse como un valor normalizado para comparar el enlace de PUH71-FITC2 a través de las muestras. Específicamente, cuando se evalúan en muestras de CML, las células de CML con crisis de blastocito (bcCML) presentaron el enlace más alto a PU-FITC (4 veces más con relación a los linfocitos normales) y demostraron la sensibilidad más alta al tratamiento con PU-H71 cuando se compararon con la fase crónica (cpCML) (**Figura 16**). En contraste, PU-H71 se enlazó débilmente a HSP90 en células sanguíneas normales (valores IC₅₀ mayores que 2,000nM contra ~100nM en bcCML) y fue no tóxico en estas células en concentraciones que fueron tóxicas para las células cancerosas (**Figuras 1d, e y 16B, C**). La **Figura 16C** muestra la gráfica que correlaciona las relaciones obtenidas al analizar el enlace de PU-H71-FITC2 a blastocitos y a linfocitos normales en 19 muestras de AML primarias (reportadas como PU plegado enlazadas en el eje X) y la viabilidad medida de los blastocitos cuando se tratan con PU-H71. Las células tumorales responsivas (>50% de viabilidad reducida) respecto a las sin respuesta (<50% viabilidad reducida) podrían diferenciarse por una relación de alrededor de 2.31 hasta alrededor de 7.43 o superior comparado con alrededor de 0.65 hasta alrededor de 2.22 o menor, respectivamente.

Adicionalmente, en un panel de 14 líneas celulares de leucemia también notamos una correlación importante entre el enlace de PU-H71-FITC2 (como se presenta en la intensidad de fluorescencia media) y la sensibilidad de estas células para la inhibición de HSP90 por PU-H71 (**Figura 3e**).

Basado en los datos recolectados para los 19 especímenes de AML primarios, hemos calculado la sensibilidad y curvas de exactitud para determinar la probabilidad del ensayo para identificar correctamente los especímenes de AML resistentes y sensibles. Realizamos un análisis de desempeño de clasificación usando un valor de corte arbitrario de 2 o superior para el enlace de PU-FITC (blastocito/linfocito) y menor que 50% de viabilidad como un resultado predicho, y se observaron los siguientes valores: Exactitud: 83.3% (53.2 - 93.8%; 95% CI); Sensibilidad: 91.7% (72.8 - 99.5%; 95% CI); Especificidad: 66.7% (28.9% - 82.4%; 95% CI); Valor predictivo positivo: 84.6% (67.2 - 91.9%; 95% CI); Valor predictivo negativo: 80% (34.7% - 98.9%; 95% CI); prueba exacta de Fisher, p = 0.022. Estos cálculos sugieren que PU-FITC tiene un buen desempeño de clasificación; esta evaluación se repetirá con una cohorte más grande de muestras para obtener estimados de desempeño más exactos y precisos. Para minimizar las diferencias del ensayo debido a la variación experimental o del instrumento, se usará lo siguiente: (1) las perlas de seguimiento e instalación de citómetro BD (CST) para ajustes de desempeño automáticos y mejorar la consistencia y desempeño del citómetro día a día. Las perlas CST se utilizarán antes de cada nuevo conjunto experimental. (2) MV411 de control positivo (enlace alto de línea celular sensible) y un HL60 de control negativo (enlace bajo de línea celular de sensibilidad baja) se incluirá en los ensayos.

Para determinar si las observaciones *in vitro* en las células de leucemia pueden confirmarse en modelos preclínicos animales, establecimos xenotrasplantes usando muestras de AML primarias con diferentes sensibilidades (alta y baja) para PU-H71 evaluado *in vitro* y/o predicho por el enlace PU-FITC. Las células AML primarias se inyectaron en ratones NOD/SCID irradiados subletalmente (n=8). Entre tres y cuatro semanas después de la inyección, cuando las células de leucemia humanas se han injertado en la médula ósea (BM) del ratón, el tratamiento con PU-H71 o control de vehículo se inició (75mg/kg 3x semana) y continuó durante cuatro semanas. Los ratones se sacrificaron y el injerto de leucemia se evaluó usando CD45 y CD34 antihumano. Para determinar la capacidad de las células sobrevivientes para dar lugar a la enfermedad, se han trasplantado números iguales de células humanas en ratones NOD/SCID irradiados subletalmente. Este experimento determina si el tratamiento con PU-H71 para las células de sensibilidad *in vitro* altas de enlace alta previene el inicio del tumor adicional. Si ese es el caso, se sugerirá que el tratamiento disminuirá la probabilidad de recaída. Debido a que los xenoinjertos pueden alterar la biología de la muestra de leucemia, el enlace PUH71-FITC2 a las células primarias se evaluó antes de la inyección de las células injertadas (4 semanas después del trasplante).

Los resultados de los experimentos de xenotrasplante se representan en la **Figura 17**. En los experimentos usando dos muestras de AML primarias (sensibilidad alta y sensibilidad baja, **Figuras 17a**), se ha encontrado que la muestra de sensibilidad alta tiene un enlace PUH71-FITC2 superior que la muestra de sensibilidad baja en la muestra AML de xenoinjerto (**Figura 17b**) y responde significativamente mejor al tratamiento con un inhibidor de HSP90 (**Figura 17c**). Además se ha encontrado que las células de la AML de sensibilidad alta a PU muestran un injerto significativamente disminuido en trasplantes secundarios (p=0.016). Los resultados muestran que la implicación de HSP90 en la supervivencia y proliferación de las células de leucemia de pacientes en etapas similares de la enfermedad puede ser sustancialmente diferente. Adicionalmente, el efecto de la terapia de inhibición de HSP90 puede predecirse a partir de usar sondas fluorescentemente etiquetadas de la presente descripción.

5.2.1.2.2. Tumores Sólidos y Líquidos

Las sondas fluorescentemente etiquetadas, etiquetadas con ANCA y biotiniladas de la presente descripción también tienen aplicaciones de pronóstico y de diagnóstico para tumores sólidos y linfomas y otros cánceres asociados a tumor líquido. Ejemplos de tales tumores son aquellos asociados con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, carcinoma de células basales, melanoma, carcinoma

de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, un cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, neuroblastoma, cánceres gastrointestinales incluyendo tumores estromales gastrointestinales, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de la vesícula biliar, cáncer anal, tumores cerebrales incluyendo gliomas, linfomas incluyendo

5 linfomas folicular y linfoma de células B grande difuso, y cánceres ginecológicos incluyendo cáncer de ovario, cervicales, y de endometrio, particularmente cáncer de mama, cáncer gástrico o cáncer pancreático. Una persona experta en el campo reconocerá que el etiquetado se puede llevar a cabo en las células tumorales que son parte de una porción de tejido tal como obtenido de una biopsia o extirpación quirúrgica de un tumor. En este caso, las células tumorales estarán rodeadas por células del estroma, tejido benigno, vasos y otras células tales como 10 linfocitos, macrófagos. El etiquetado también se puede llevar a cabo en las células tumorales disociadas tales como aquellas obtenidas de tejidos que contienen tales células tumorales. El etiquetado también se puede llevar a cabo en las células tumorales tales como aquellas obtenidas de las líneas de las células cancerosas establecidas. No obstante, el etiquetado también se puede llevar a cabo en las células tumorales tales como aquellas obtenidas de 15 fluidos biológicos que contienen tales células tumorales incluyendo plasma y pleura. En una modalidad, el etiquetado se puede llevar a cabo en las células tumorales y las células asociadas con el tumor y cuerpos biológicos tales como aquellos encontrados en la circulación de pacientes con cáncer, células obtenidas por aspirados con aguja fina u otros procedimientos de intervención que dan por resultado una biomuestra que contiene células cancerosas u otros tipos de células o formaciones biológicas que contienen la "HSP90 oncogénica". En todavía otra modalidad, el etiquetado se puede llevar a cabo en otras células asociadas con la transformación maligna o cuerpos biológicos 20 que incorporan la HSP90 oncogénica, tales como los exomas tumorales. Por ejemplo, la Sección 6.3.8. describe el aislamiento del tejido para tinción de un paciente con cáncer gástrico y cáncer de mama después de la extirpación quirúrgica y la Sección 5.2.1.2.4. describe el aislamiento de las células tumorales circulantes de un paciente con cáncer.

25 Experimentos en las líneas de células cancerosas pancreático y de mama indican que los análisis realizados en los tumores de sangre también son válidos en los tumores sólidos y linfomas. Los inhibidores de HSP90 permeables a las células etiquetados, pueden, por lo tanto, detectar y cuantificar la "HSP90 oncogénica" presente en las células de tumores sólidos o células de linfoma. Por otra parte, los inhibidores se pueden usar para predecir la sensibilidad de tumores sólidos o líquidos a la terapia de inhibición de HSP90. Una persona experta en el campo reconocerá que los 30 tumores líquidos se asocian pero no se limitan a leucemias, linfomas, mielomas y neoplasias mieloproliferativas. Tal persona también reconocerá que ciertos tumores líquidos también pueden formar tumores sólidos, y que además de la sangre, las células cancerosas asociadas con estas enfermedades pueden propagarse a los ganglios linfáticos, vaso, hígado, medula ósea y otros sitios.

35 En un ejemplo, un panel de células cancerosas pancreático y de mama se sometieron a prueba para verificar (1) la sensibilidad a varios inhibidores de HSP90 distintos tales como PU-H71, SNX-2112 y NVP-AUY922 (véase la Figura 2); (2) ligación al PU-H71-FITC2; y (3) expresión del HSP90 total en estas células tumorales. La **Figura 18** muestra una correlación significativa entre la ligación y sensibilidad del PU-H71-FITC2 de estas células a PU-H71, SNX-2112 y NVP-AUY922 ($r^2 = 0.59, 0.62$ y 0.61 , respectivamente de la **Figura 18A**). En contraste no se determinó una correlación significativa entre la sensibilidad a los inhibidores de HSP90 y la expresión de la HSP90 tumoral total en estas células (**Figura 18C**). Similarmente, no se pudo establecer una correlación significativa entre la expresión de "HSP90 oncogénica" como es determinado por PU-FITC y la expresión de la HSP90 tumoral total en estas células (**Figura 18B**). Las células de leucemia HL-60 son resistentes al PU-H71 y otros inhibidores de HSP90 y muestran una ligación de baja a nula a PU-FITC. De esta manera, los inventores justificaron que el uso de la ligación relativa de un inhibidor de HSP90 etiquetado (*por ejemplo*, PU-H71-FITC2) en las células cancerosas en comparación con el HL-60 también se puede usar como un valor normalizado para comparar la ligación de PU-FITC a través de las 40 muestras y experimentos (**Figura 18D**). La **Figura 18** muestra tal análisis usando la relación del PUH71 etiquetado (*por ejemplo*, PU-H71-FITC2) que se liga a la célula cancerosa respectiva y al HL60 en varias células cancerosas pancreático y de mama. Colectivamente, estos datos indican que: (1) el PU-FITC es una herramienta apropiada para 45 medir la abundancia de la "HSP90 oncogénica"; (2) la medición de la abundancia de la "HSP90 oncogénica" predice la sensibilidad a HSP90; y (3) la abundancia de la HSP90 tumoral total no es predictiva de la respuesta a los inhibidores de HSP90 ni se correlaciona con la abundancia de la "HSP90 oncogénica" como es medido por PU-H71 etiquetado.

50 Los inhibidores de HSP90 etiquetados de la presente descripción se pueden usar para determinar si un paciente se beneficiará de la terapia de inhibición de HSP90. En una modalidad, la ligación del inhibidor de HSP90 etiquetado a las células tumorales del paciente se puede comparar con la ligación a las células de control. La ligación incrementada relativa con el control indica que el paciente será apto para la terapia de inhibición de HSP90. Como 55 se muestra en la **Figura 19**, se pueden diferenciar las células que responden (>50% de viabilidad reducida) de las que no responden (<50% de viabilidad reducida) por una relación de PU-H71-FITC2 que se liga a las células tumorales y a las células HL60 de referencia de aproximadamente 2.7 a aproximadamente 5.87 o superior para células que responden comparadas con aproximadamente 1.23 o aproximadamente 2.07 o inferior para las células 60 que no responden. Se entenderá que estas relaciones para determinar la respuesta al inhibidor de HSP90 dependerá del carácter del inhibidor de HSP90 etiquetado y la muestra de referencia (*es decir*, células HL60, leucocitos normales, células CD45+CD14, o linfocitos normales en la sangre) y/o derivado de control (*es decir* PUFITC9 o FITC-TEG usados para explicar la ligación no específica/de fondo) usado en el ensayo.

Una descripción más detallada de la invención en el etiquetado de la HSP90 oncogénica en las células tumorales circulantes se proporciona en la sección 5.2.1.2.4. La **Figura 20** muestra el uso de PUFITC9 como un derivado de PU diseñado para tener una ligación de baja a nula a la HSP90 oncogénica, y de esta manera explicar la ligación no específica/de fondo. También muestra el uso de leucocitos del paciente (células CD45+CD14-) como una célula de referencia (células con HSP90 oncogénica de baja a nula).

Los experimentos en las células de linfoma de células B grande difuso (DLBCL) también indican que la sensibilidad de estas células a los inhibidores de HSP90 se correlaciona con su captación del PU-H71 etiquetado pero no con la expresión del HSP90 tumoral total en la célula (**Figura 21**). Específicamente, OCI-Ly7 y OCI-Ly1 son dos células de DLBCL altamente sensibles a la inhibición de HSP90 (Cerchietti y colaboradores Nature Medicine 2009). Ambos son ligadores de PU-H71 ávidos. Los inventores trataron estas células durante un período de tiempo prolongado con concentraciones subterapéuticas de inhibidores de HSP90 y fueron capaces de seleccionar los clones que mostraron una sensibilidad 5 a 10 veces menor que las células precursoras a varios inhibidores de HSP90 sometidos a prueba, tales como PU-H71, PU-DZ13 y 17DMAG (**Figura 8**). La **Figura 21** muestra que, mientras que estos clones expresan niveles de HSP90 tumoral total similares a las células Ly1 precursoras, tienen menores niveles de “HSP90 oncogénica” según es medido por la captación de PU-H71 etiquetado. El experimento de ligación se lleva a cabo en presencia y ausencia de PSC833 (2.5 μ M), un inhibidor de P-gP, para demostrar que la captación diferencial fue un resultado de distintos niveles de “HSP90 oncogénica” y no una medida indirecta del flujo de salida mediado por la bomba de fármacos.

5.2.1.2.2.1. Adenocarcinoma ductal pancreático (ejemplo comparativo)

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es la cuarta causa más común de mortalidad relacionada con cáncer en los Estados Unidos. La tasa de supervivencia de cinco años es la más baja entre todos los cánceres, con estimaciones que varían de 0.4 a 4 por ciento. En el 2009, se estima que se diagnosticaron 42.470 nuevos casos de PDAC, y se estima que murieron 35.240 pacientes como resultado de su enfermedad. Debido a la agresividad de este cáncer, la incapacidad para diagnosticarlo temprano, y la falta actual de terapias que alteran el resultado, las tasas de mortalidad del PDAC reflejan estrechamente las tasas de incidencia. El único tratamiento potencialmente curativo para el PDAC es la extirpación quirúrgica. Debido a que la enfermedad está generalmente avanzada cuando se presenta, solamente del 10 al 20 por ciento de los pacientes son elegibles para la extirpación curativa. En estos pacientes quienes se someten a una pancreaticoduodenectomía, la supervivencia de cinco años sigue siendo deprimente, aproximadamente del 20%. El desarrollo de agentes quimioterapéuticos efectivos para tratar el PDAC ha sido enormemente difícil. Los agentes citotóxicos tradicionales son en gran medida ineficaces en el control del crecimiento tumoral, en mejorar la calidad de vida y en prolongar la supervivencia del paciente.

Para tolerar la carga compleja de vías y moléculas aberrantes, los PDACs son dependientes para la supervivencia de las chaperonas moleculares. La chaperona principal, la proteína 90 de choque térmico (HSP90), ayuda e induce a las oncoproteínas a impulsar los procesos malignos en el PDAC, tal como proliferación, supervivencia y metástasis, y permite el desarrollo de un fenotipo canceroso. Además, la HSP90 ayuda a las células cancerosas a formar resistencia a otras terapias al incrementar el umbral apoptótico. Estas funciones biológicas exhaustivas proponen una función importante para la terapia dirigida anti-HSP90 en el PDAC. En consecuencia, estos tumores son candidatos apropiados para el tratamiento con inhibidores de una de las principales chaperonas de cáncer, HSP90.

La identificación de la abundancia de especies de HSP90 tumorales requeridas para la supervivencia del cáncer pancreático por medio de inhibidores de HSP90, tal como PU-H71 que se liga de manera preferente a las especies de HSP90 oncogénicas, servirá como un biomarcador específico de tumor para la selección de pacientes que se beneficiarán probablemente de la terapia de HSP90 y para personalizar la orientación terapéutica de los tumores.

De hecho, la sensibilidad de las líneas de células pancreáticas a los inhibidores de HSP90 se correlaciona con la abundancia de especies de HSP90 tumorales, como es medido por la captación celular de PU-H71 etiquetado con fluoresceína (PU-H71-FITC2) (**Figura 22**). Las células que toman la cantidad más alta de PU-H71-FITC2 también son aquellas más sensibles a los inhibidores de HSP90.

Al igual que con los estudios con cánceres de sangre (Sección 5.2.1.2.1.), mientras es más alta la ligación relativa del inhibidor de HSP90 etiquetado (*por ejemplo* PU-H71-FITC2) en las células cancerosas pancreático en comparación con las células derivadas de referencia o de referencia (*por ejemplo*, células HL60 o normales), será más susceptible al tumor pancreático o las células tumorales a la terapia del inhibidor de HSP90 (**Figura 19**). En algunas modalidades, una relación de ligación de células tumorales respecto a células de referencia de aproximadamente 2 o mayor indica que un paciente con cáncer pancreático será susceptible a la terapia de inhibición de HSP90. En otras modalidades, una relación de ligación de tumor de cáncer pancreático o células tumorales respecto a las células de referencia de 2.5 o mayor indica que un paciente con cáncer será susceptible a la terapia de inhibición de HSP90. En otras modalidades, una relación de ligación del tumor de cáncer pancreático o células tumorales respecto a las células de referencia de 3 o mayor indica que un paciente con cáncer será susceptible a la terapia de inhibición de HSP90.

5.2.1.2.3. Células Madre Cancerosas (ejemplo comparativo)

La presente descripción proporciona métodos para determinar la cantidad de "HSP90 oncogénica" en células madre cancerosas (CSCs) respecto a las células normales (*por ejemplo*, linfocitos) y determinar en consecuencia si las CSCs responden a la terapia del inhibidor de HSP90. La evidencia reciente sugiere que las células madre cancerosas (CSCs) son capaces de originar y mantener la enfermedad para un diverso tipo de cánceres. Por otra parte, se ha mostrado que estas células son resistentes a los agentes quimioterapéuticos comunes y de esta manera es más probable que den por resultado una recaída de la enfermedad o metástasis. Por lo tanto, es crítico identificar las terapias que puedan eliminar las CSCs a fin de obtener mejores resultados terapéuticos. Las proteínas de choque térmico (HSPs) desempeñan una función de vigilancia importante en la síntesis, mantenimiento y degradación de las proteínas. En la Figura 23, los inventores proporcionan datos en células madre de leucemia mieloide aguda (AML)

que muestran que las poblaciones de CSC son sensibles a la inhibición de HSP90 y que la sensibilidad se correlaciona con la abundancia de las especies de HSP90 tumoral oncogénica, como es reconocido por un PU-H71 etiquetado.

La **Figura 23A** muestra la relación de ligación de PU-FITC a células madre de leucemia (LSCs, CD34+CD38-CD45dim) y a linfocitos. Las muestras de AML primarias se incubaron con PU-H71-FITC2 1 μ M a 37°C durante 4 h.

Las células se tiñeron con CD34, CD38, CD45 y 7-AAD seguido por el análisis de citometría de flujo. La **Figura 23B** muestra el porcentaje de viabilidad de las LSCs en relación con el control no tratado de estas muestras de AML primarias después de 48 horas de tratamiento con PU-H71 1 μ M. Las células se tiñeron con CD45, CD34 y CD38 antes de la tinción con Anexina V y 7-AAD. La viabilidad en las LSCs se midió por citometría de flujo y se determinó como el porcentaje de Anexina V/7-AAD de la acumulación CD45dim CD34+CD38. Notablemente, las células con la mayor ligación a PU-H71-FITC2 fueron más susceptibles al tratamiento con el inhibidor de HSP90.

Al igual que con los estudios con los cánceres de sangre (Sección 5.2.1.2.1.), mientras más alta es la ligación relativa del inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado (*por ejemplo* PU-H71-FITC2) en las CSCs comparado con las células normales (*por ejemplo*, linfocitos) dentro del mismo paciente, más susceptibles serán las CSCs a la terapia de inhibidor de HSP90. En algunas modalidades, una relación de CSCs de ligación a linfocitos normales de 1.5 o mayor indica que un paciente con cáncer será susceptible a la terapia de inhibición de HSP90. En otras modalidades, una relación de CSCs de ligación a linfocitos normales de 2 o mayor indica que un paciente con cáncer será susceptible a la terapia de inhibición de HSP90.

5.2.1.2.4. Células Tumorales Circulantes (ejemplo comparativo)

Las células tumorales circulantes (CTCs) son células que se han separado de un tumor primario y circulan en la corriente sanguínea. Las CTCs pueden constituir semillas para el crecimiento subsecuente de tumores adicionales (metástasis) en diferentes tejidos. La **Figura 20** muestra el etiquetado de las CTCs aisladas de un paciente con cáncer de mama HER2+ metastásico. Las células tumorales aisladas del plasma se ligan alrededor de 84 veces más de PUFITC que los leucocitos (células CD45+CD14) también aisladas del plasma, indicando que estas células tumorales tienen altos niveles de la HSP90 oncogénica y que la terapia con un inhibidor de un HSP90 sería efectiva en exterminarlas. De hecho, veinticuatro horas después de que este paciente recibió una dosis de 20mg/m² de PU-H71, se midió una caída de 6 veces en el número de CTCs en la sangre.

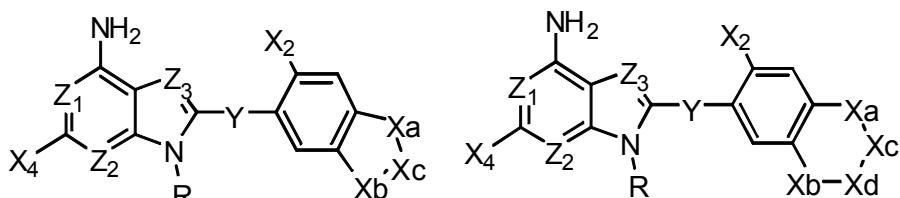
5.2.2. Sondas Radioetiquetadas para Detectar HSP90 Oncogénica (ejemplo comparativo)

La descripción proporciona el uso de sondas radioetiquetadas que son capaces de detectar la HSP90 oncogénica en células cancerosas. La Sección 5.2.2.1 describe los diversos tipos de sondas que se usan de acuerdo con la presente descripción. La Sección 5.2.2.2 describe el uso de tales sondas en los ensayos de pronóstico y de diagnóstico.

5.2.2.1. Sondas Radioetiquetadas

Los inhibidores de HSP90 que se pueden etiquetar sin cambiar el perfil de afinidad, selectividad o biodistribución del inhibidor son las sondas ideales para propósitos de pronóstico y/o de diagnóstico. En una modalidad, la sonda es una versión radioetiquetada con yodo 124 de inhibidor de HSP90. En otra modalidad, la sonda es una versión radioetiquetada con yodo 131 del inhibidor de HSP90. En otra modalidad, la sonda es una versión radioetiquetada con yodo 123 del inhibidor de HSP90. En otra modalidad, la sonda es una versión radioetiquetada con yodo 125 del inhibidor de HSP90.

En una modalidad, la sonda radioetiquetada es un compuesto de la siguiente fórmula:



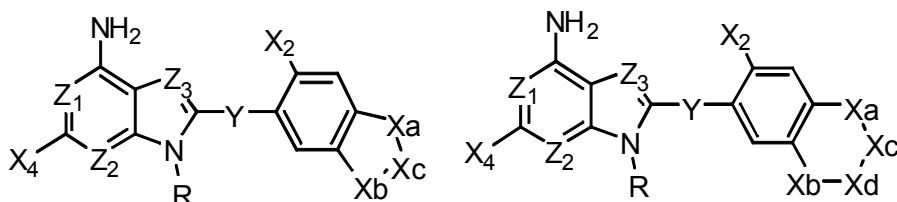
(IA)

(IB)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- (a) cada uno de Z_1 , Z_2 y Z_3 es independientemente CH o N;
- (b) Y es CH₂, O, o S;
- 5 (c) X_a, X_b, X_c y X_d son independientemente seleccionados de CH, CH₂, O, N, NH, S, carbonilo, fluorometileno, y difluorometileno seleccionado con el fin de satisfacer la valencia, en donde cada enlace a un grupo X es ya sea un enlace sencillo o un enlace doble;
- (d) X₂ es ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I o ¹³¹I;
- (e) X₄ es hidrógeno o halógeno; y
- 10 (f) R es alquilo sustituido o no sustituido ramificado o de cadena recta, alquenilo sustituido o no sustituido ramificado o de cadena recta, alquinilo sustituido o no sustituido ramificado o de cadena recta, o cicloalquilo sustituido o no sustituido, en donde el grupo R está opcionalmente interrumpido por -S(O)N(R_A)-, -NR_AS(O)-, -SO₂N(R_A)-, -NR_ASO₂-, -C(O)N(R_A)-, o -NR_AC(O)-, y/o el grupo R está opcionalmente terminado por -S(O)NR_AR_B, -NR_AS(O)R_B, -SO₂NR_AR_B, -NR_ASO₂R_B, -C(O)NR_AR_B, o -NR_AC(O)R_B, en donde cada R_A y R_B está independientemente seleccionado de hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, arilalquilo, alquilheteroarilo, heteroarilalquilo, y alquilheteroarilalquilo.

En otra modalidad, la sonda radioetiquetada es un compuesto de la siguiente fórmula:



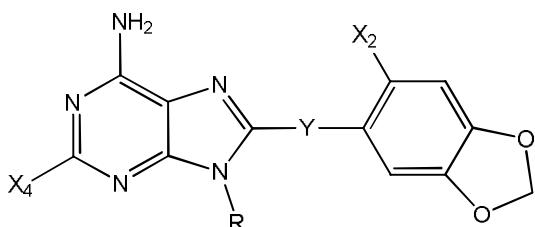
(IA)

(IB)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- (a) cada uno de Z_1 , Z_2 y Z_3 es independientemente CH o N;
- (b) Y es CH₂, O, o S;
- 25 (c) X_a, X_b, X_c y X_d son independientemente seleccionados de CH, CH₂, O, N, NH, S, carbonilo, fluorometileno, y difluorometileno seleccionado con el fin de satisfacer la valencia, en donde cada enlace para un grupo X es ya sea un enlace sencillo o un enlace doble;
- (d) X₂ es ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I o ¹³¹I;
- (e) X₄ es hidrógeno o halógeno; y
- 30 (f) R es -(CH₂)_m-N-R₁₀R₁₁R₁₂ o -(CH₂)_m-N-R₁₀R₁₁, donde m es 2 o 3 y donde R₁₀-R₁₂ son independientemente seleccionados de hidrógeno, metilo, etilo, etenilo, etinilo, propilo, hidroxialquilo, isopropilo, t-butilo, isobutilo, ciclopentilo, un anillo de 3 miembros incluyendo el nitrógeno o un anillo de 6 miembros incluyendo el N y opcionalmente un heteroátomo adicional con sustituyentes para satisfacer la valencia, con la condición de que cuando todos de R₁₀-R₁₂ están presentes el compuesto comprende además un ión contador farmacéuticamente aceptable.

35 En otra modalidad, la sonda radioetiquetada es un compuesto de la siguiente fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

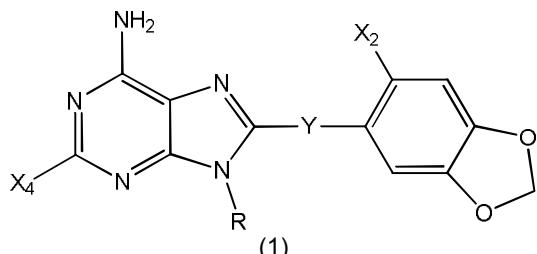
Y es CH₂ o S;

X₄ es H o halógeno

X₂ es ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I o ¹³¹I; y

- 5 R es -(CH₂)_m-N-R₁₀R₁₁R₁₂ o -(CH₂)_m-N-R₁₀R₁₁, donde m es 2 o 3 y donde R₁₀-R₁₂ son independientemente seleccionados de hidrógeno, metilo, etilo, etenilo, etinilo, propilo, hidroxialquilo, isopropilo, t-butilo, isobutilo, ciclopentilo, un anillo de 3 miembros incluyendo el nitrógeno o un anillo de 6 miembros incluyendo el N y opcionalmente un heteroátomo adicional con sustituyentes para satisfacer la valencia, con la condición de que cuando todos de R₁₀-R₁₂ se presentan el compuesto además comprende un ión contador farmacéuticamente aceptable.

10 En una modalidad, la sonda radioetiquetada es un compuesto de la siguiente fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

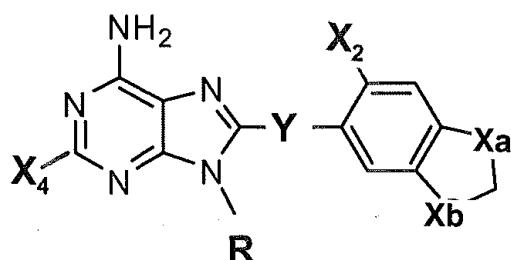
- 15 Y es CH₂ o S;

X₄ es H o halógeno;

X₂ es ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I o ¹³¹I; y

- 20 R es isopropilamida del ácido 2-etanosulfónico, etilamida del ácido 2-etanosulfónico, metilamida del ácido 2-etanosulfónico, amida del ácido 2-etanosulfónico, t-butilamida del ácido 2-etanosulfónico, isobutilamida del ácido 2-etanosulfónico, ciclopropilamida del ácido 2-etanosulfónico, 2-etilamida del ácido isopropanosulfónico, 2-etilamida del ácido etanosulfónico, N-2 etil metanosulfonamida, 2-etilamida del ácido 2-metil-propan-2-sulfónico, 2-etilamida del ácido 2-metil-propan-2-sulfínico, 2-etilamida del ácido 2-metil-propan-1-sulfónico, 2-etilamida del ácido ciclopropanosulfónico, isopropilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, etilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, metilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, amida del ácido 3-propan-1-sulfónico, t-butilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, isobutilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, ciclopropilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, 3-propilamida del ácido propan-2-sulfónico, 3-propilamida del ácido etanosulfónico, metanosulfonamida de N-3-propilo, 3-propilamida del ácido 2-metil-propan-2-sulfónico, 3-propilamida del ácido 2-metil-propan-2-sulfínico, 3-propilamida del ácido 2-metil-propan-1-sulfónico, 3-propilamida del ácido ciclopropanosulfónico, propionamida del 3-N-isopropilo, propionamida de 3-N-etilo, propionamida del 3-N-metilo, 3-propionamida, propionamida de 3-N-t-butilo, propionamida de 3-N-isobutilo, propionamida de 3-N-ciclopropilo, isobutiramida de N-2-etilo, propionamida de N-2-etilo, acetamida de N-2-etilo, formamida de N-2-etilo, 2,2-dimetil-propionamida de N-2-etilo, 3-metilbutiramida de N-2-etilo, o 2-etilamida del ácido ciclopropan carboxílico.

- 30 35 En otra modalidad, la sonda radioetiquetada es un compuesto de la siguiente fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

uno de Xa y Xb es O y el otro es CH₂;

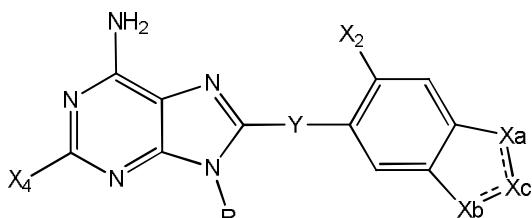
Y es CH₂ o S;

X₄ es hidrógeno o halógeno; y

X₂ es ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I o ¹³¹I; y

R es isopropilamida del ácido 2-etanosulfónico, etilamida del ácido 2-etanosulfónico, metilamida del ácido 2-etanosulfónico, amida del ácido 2-etanosulfónico, t-butilamida del ácido 2-etanosulfónico, isobutilamida del ácido 2-etanosulfónico, ciclopripilamida del ácido 2-etanosulfónico, 2-ethylamida del ácido isopropanosulfónico, 2-ethylamida del ácido etanosulfónico, metanosulfonamida de N-2 etilo, 2-ethylamida del ácido 2-metil-propan-2-sulfínico, 2-ethylamida del ácido 2-metil-propan-2-sulfínico, 2-ethylamida del ácido 2-metil-propan-1-sulfónico, 2-ethylamida del ácido ciclopropanosulfónico, isopropilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, etilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, metilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, amida del ácido 3-propan-1-sulfónico, t-butilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, isobutilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, ciclopripilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, 3-propilamida del ácido propan-2-sulfónico, 3-propilamida del ácido etanosulfónico, metanosulfonamida de N-3-propilo, 3-propilamida del ácido 2-metil-propan-2-sulfínico, 3-propilamida del ácido 2-metil-propan-1-sulfónico, 3-propilamida del ácido ciclopropanosulfónico, propionamida de 3-N-isopropilo, propionamida de 3-N-etilo, propionamida de 3-N-metilo, 3-propionamida, propionamida de 3-N-t-butilo, propionamida de 3-N-isobutilo, propionamida de 3-N-ciclopropilo, isobutiramida de N-2-etilo, propionamida de N-2-etilo, acetamida de N-2-etilo, formamida de N-2-etilo, 2,2-dimetil-propionamida de N-2-etilo, 3-metilbutiramida de N-2-etilo, o 2-ethylamida del ácido ciclopropanocarboxílico.

En otra modalidad, la sonda radioetiquetada es un compuesto de la siguiente fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

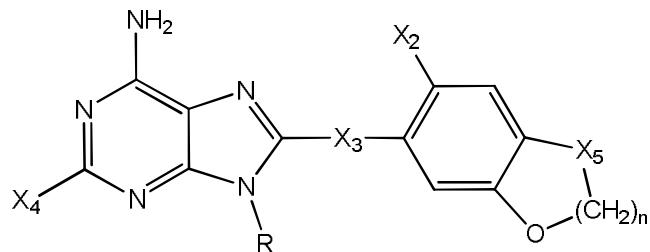
Xa-Xc-Xb es CH₂-CH₂-CH₂, CH=CH-CH₂, o CH₂-CH=CH;

Y es CH₂ o S;

X₂ es ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I o ¹³¹I; y

R es isopropilamida del ácido 2-etanosulfónico, etilamida del ácido 2-etanosulfónico, metilamida del ácido 2-etanosulfónico, amida del ácido 2-etanosulfónico, t-butilamida del ácido 2-etanosulfónico, isobutilamida del ácido 2-etanosulfónico, ciclopripilamida del ácido 2-etanosulfónico, 2-ethylamida del ácido isopropanosulfónico, 2-ethylamida del ácido etanosulfónico, metanosulfonamida de N-2 etilo, 2-ethylamida del ácido 2-metil-propan-2-sulfínico, 2-ethylamida del ácido 2-metil-propan-2-sulfínico, 2-ethylamida del ácido 2-metil-propan-1-sulfónico, 2-ethylamida del ácido ciclopropanosulfónico, isopropilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, etilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, metilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, amida del ácido 3-propan-1-sulfónico, t-butilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, isobutilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, ciclopripilamida del ácido 3-propan-1-sulfónico, 3-propilamida del ácido propan-2-sulfónico, 3-propilamida del ácido etanosulfónico, metanosulfonamida de N-3-propilo, 3-propilamida del ácido 2-metil-propan-2-sulfínico, 3-propilamida del ácido 2-metil-propan-1-sulfónico, 3-propilamida del ácido ciclopropanosulfónico, propionamida de 3-N-isopropilo, propionamida de 3-N-etilo, propionamida de 3-N-metilo, 3-propionamida, propionamida de 3-N-t-butilo, propionamida de 3-N-isobutilo, propionamida de 3-N-ciclopropilo, isobutiramida de N-2-etilo, propionamida de N-2-etilo, acetamida de N-2-etilo, formamida de N-2-etilo, 2,2-dimetil-propionamida de N-2-etilo, 3-metilbutiramida de N-2-etilo, o 2-ethylamida del ácido ciclopropáno carboxílico.

En otra modalidad, la sonda radioetiquetada es un compuesto de la siguiente fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

X₃ es CH₂, CF₂, S, SO, SO₂, O, NH, o NR², en donde R² es alquilo;

X₂ es ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I o ¹³¹I;

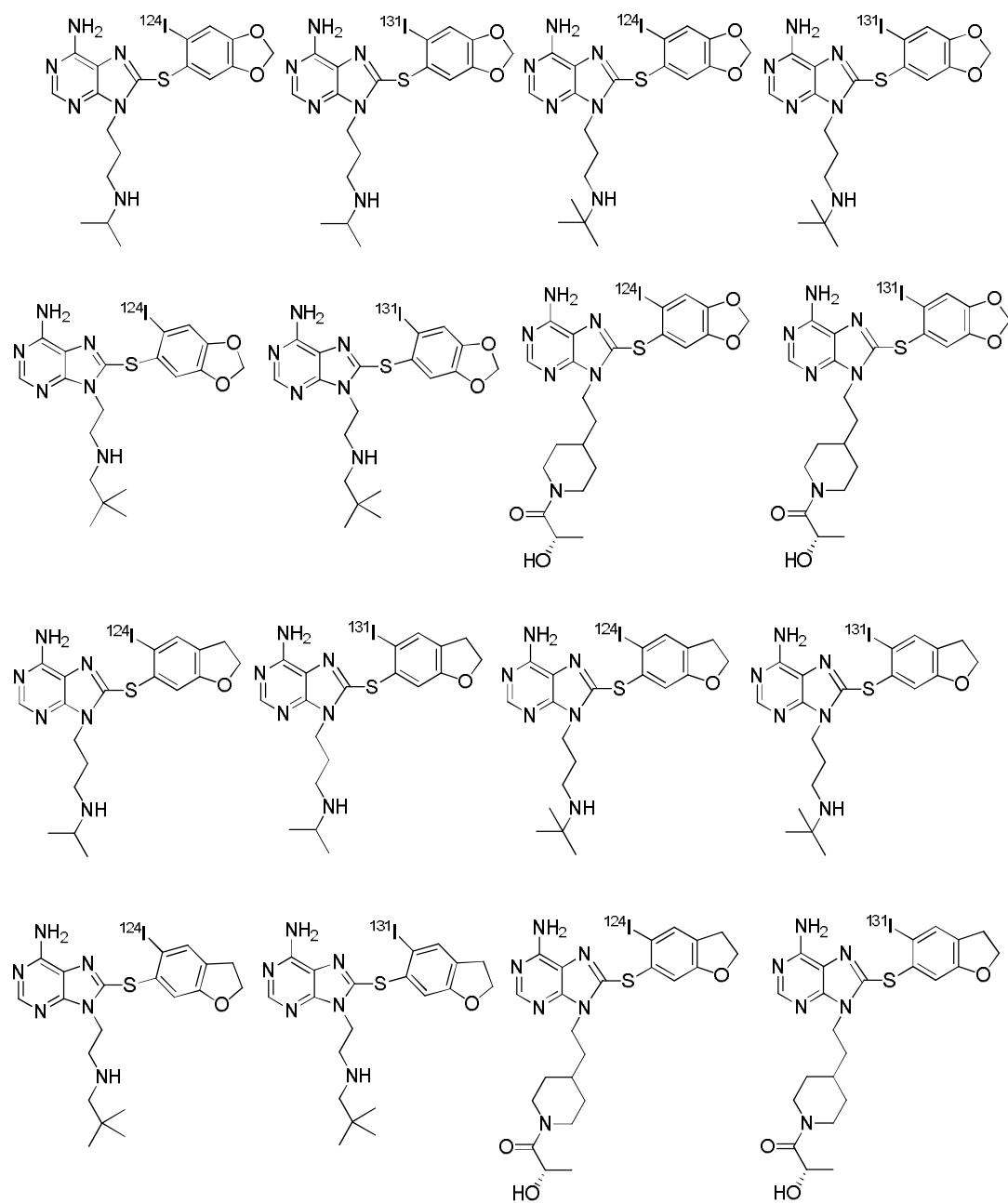
5 X₄ es hidrógeno o halógeno;

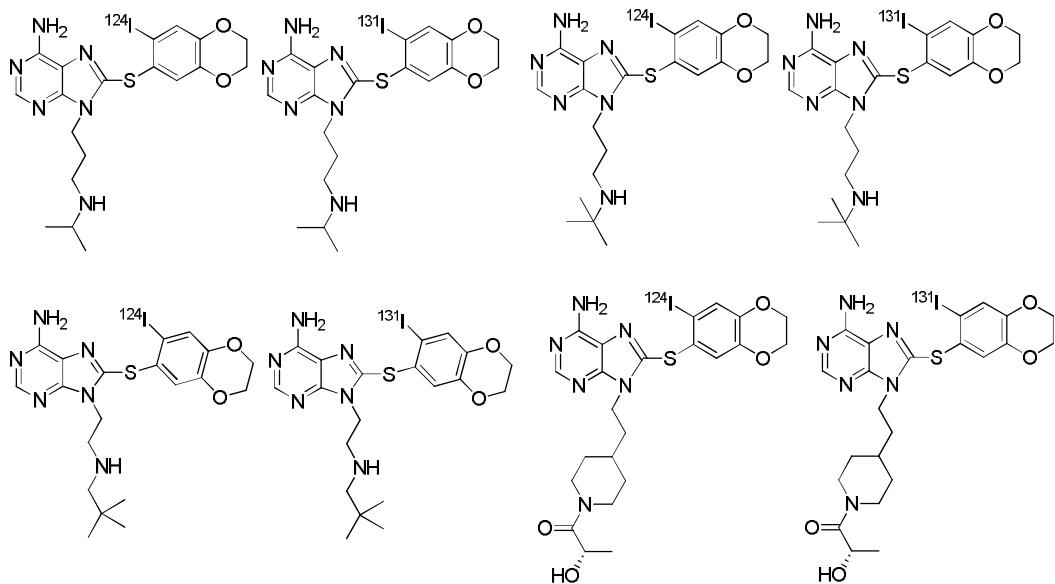
X₅ es O, o CH₂;

R es 3-isopropilaminopropilo, 3-(isopropil(metil)amino)propilo, 3-(isopropil(etil)amino)propilo, 3-((2-hidroxietil)(isopropil)amino)propilo, 3-(metil(prop-2-inil)amino)propilo, 3-(alil(metil)amino)propilo, 3-(etil(metil)amino)propilo, 3-(ciclopropil(propil)amino)propilo, 3-(ciclohexil(2-hidroxietil)amino)propilo, 3-(2-metilaziridin-1-il)propilo, 3-(piperidin-1-il)propilo, 3-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)propilo, 3-morfolinopropilo, 3-(trimetilamonio)propilo, 2-(isopropilamino)etilo, 2-(isobutilamino)etilo, 2-(neopentilamino)etilo, 2-(ciclopropilmethylamino)etilo, 2-(etil(metil)amino)etilo, 2-(isobutil(metil)amino)etilo, o 2-(metil(prop-2-inil)amino)etilo; y

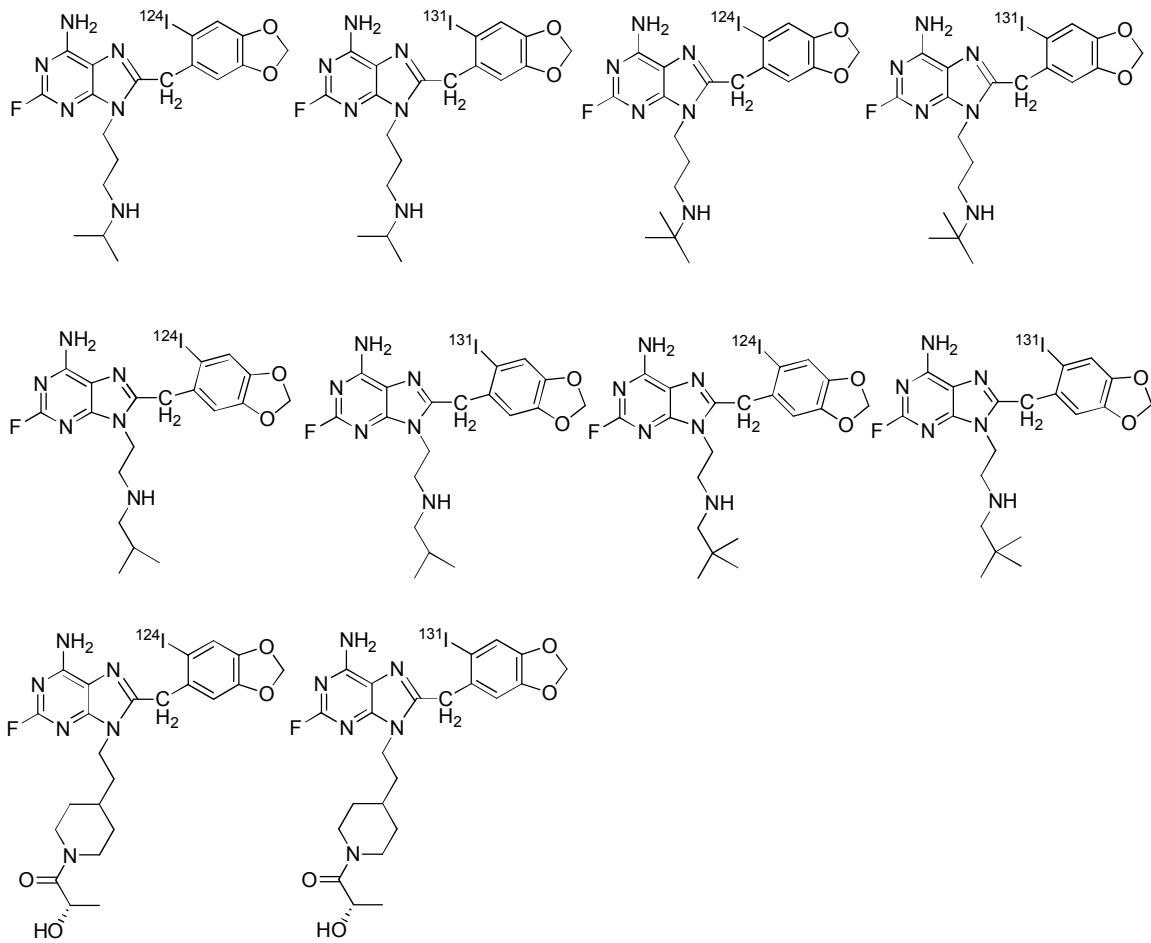
n es 1 o 2.

15 En otra modalidad, la sonda radioetiquetada se selecciona de un compuesto que tiene las siguientes fórmulas:

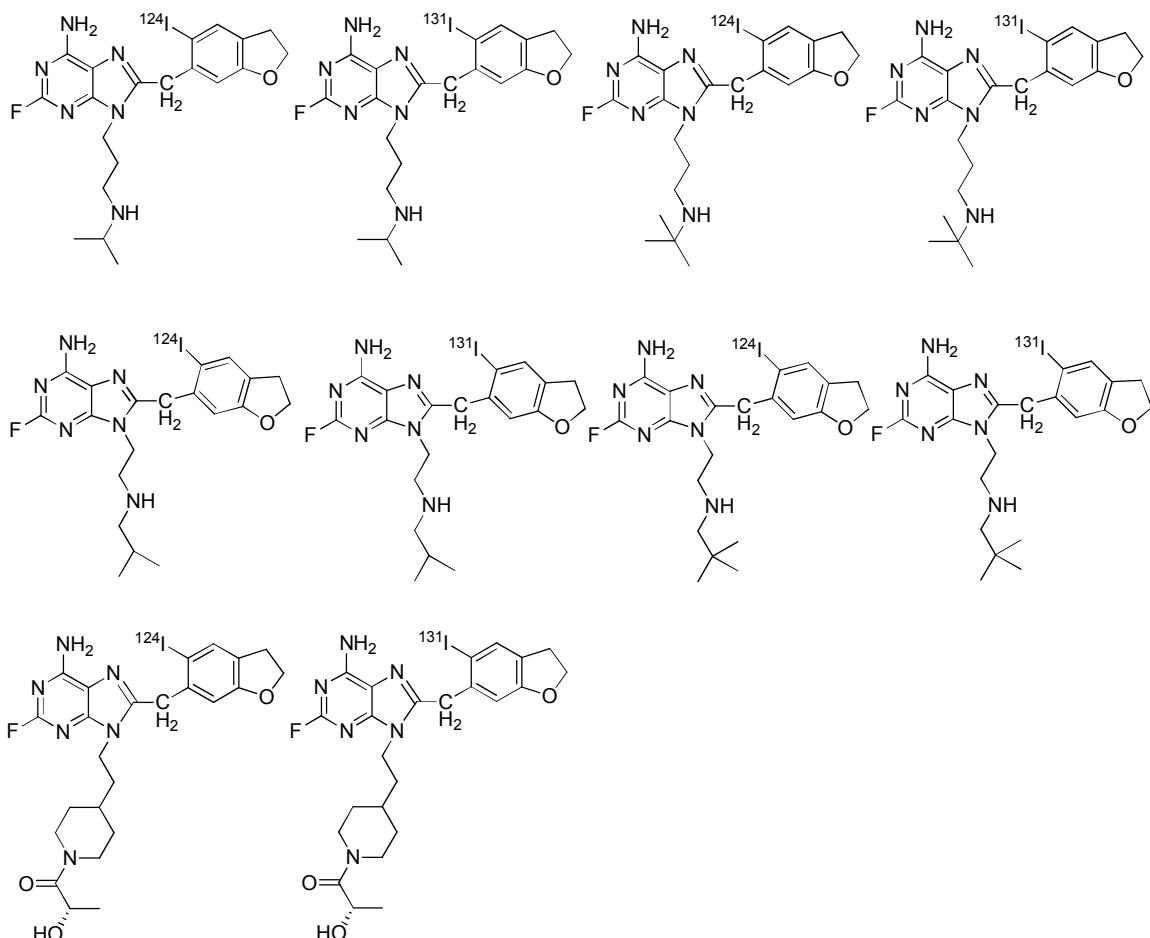




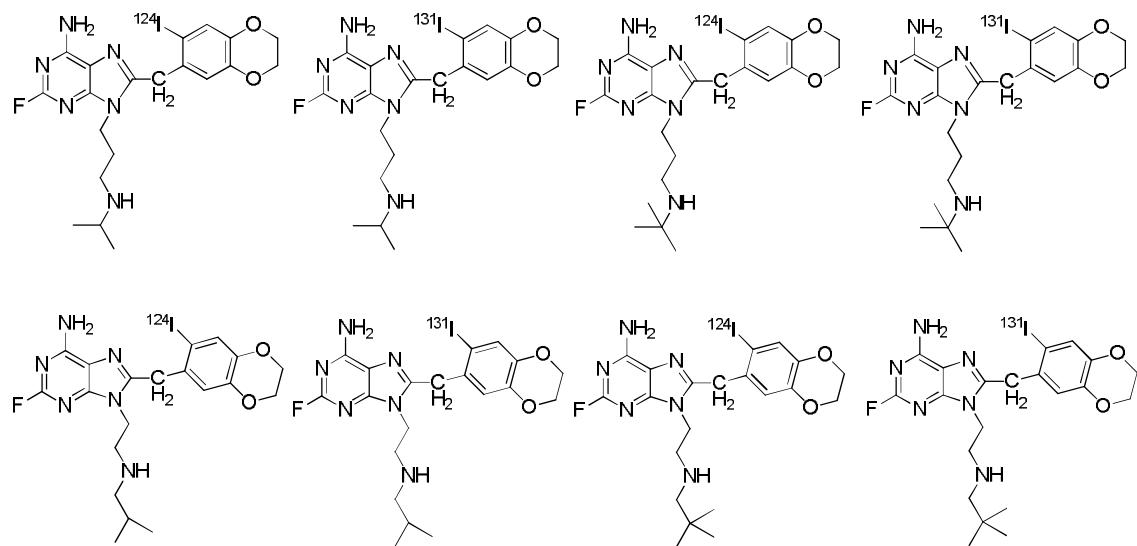
En otra modalidad, la sonda radioetiquetada se selecciona de un compuesto que tiene la siguientes fórmulas:

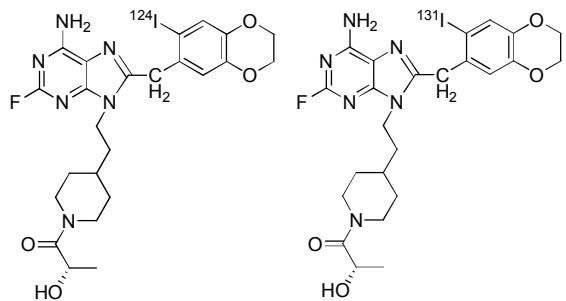


Todavía en otra modalidad, la sonda radioetiquetada se selecciona de un compuesto que tiene las siguientes fórmulas:

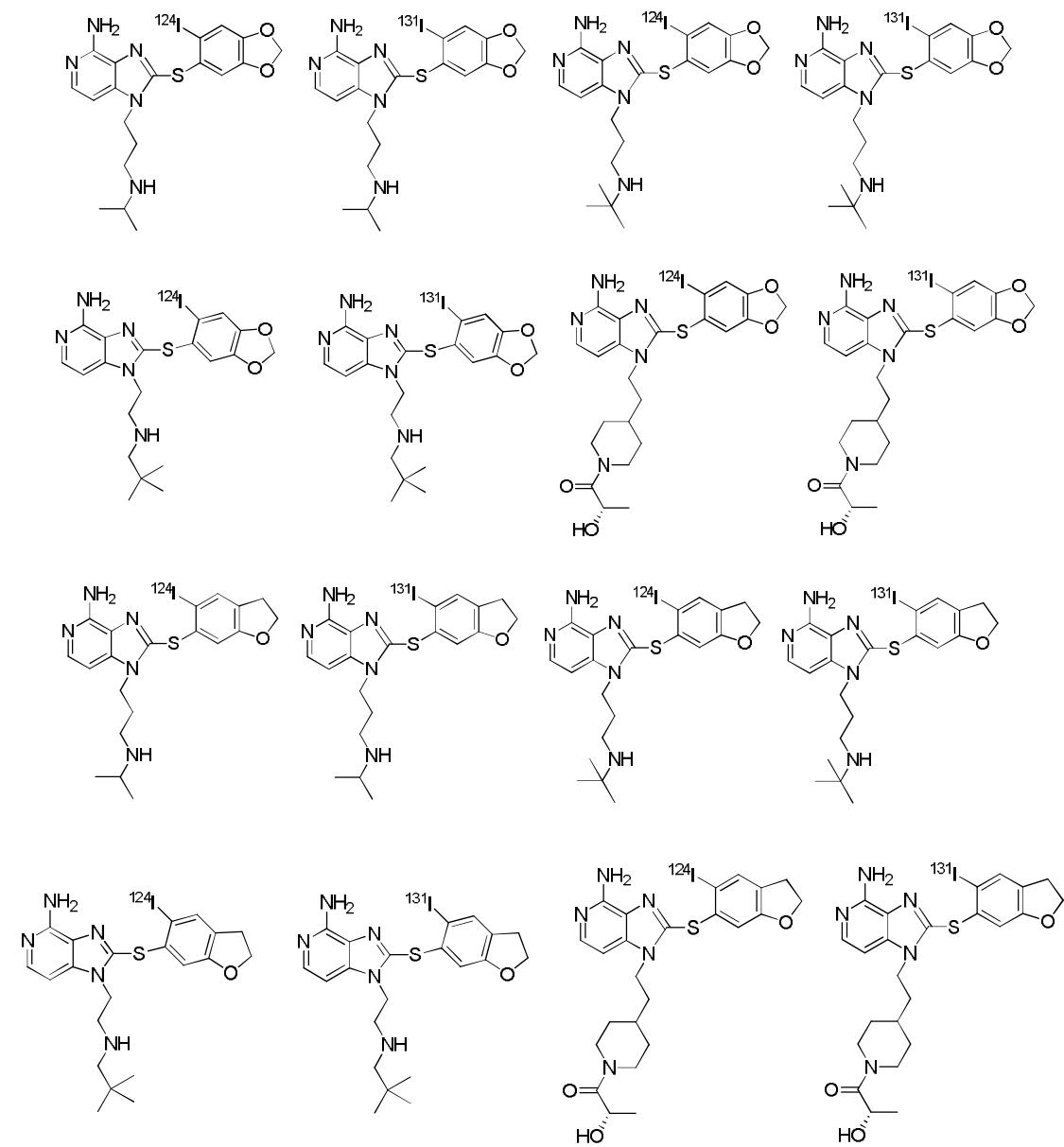


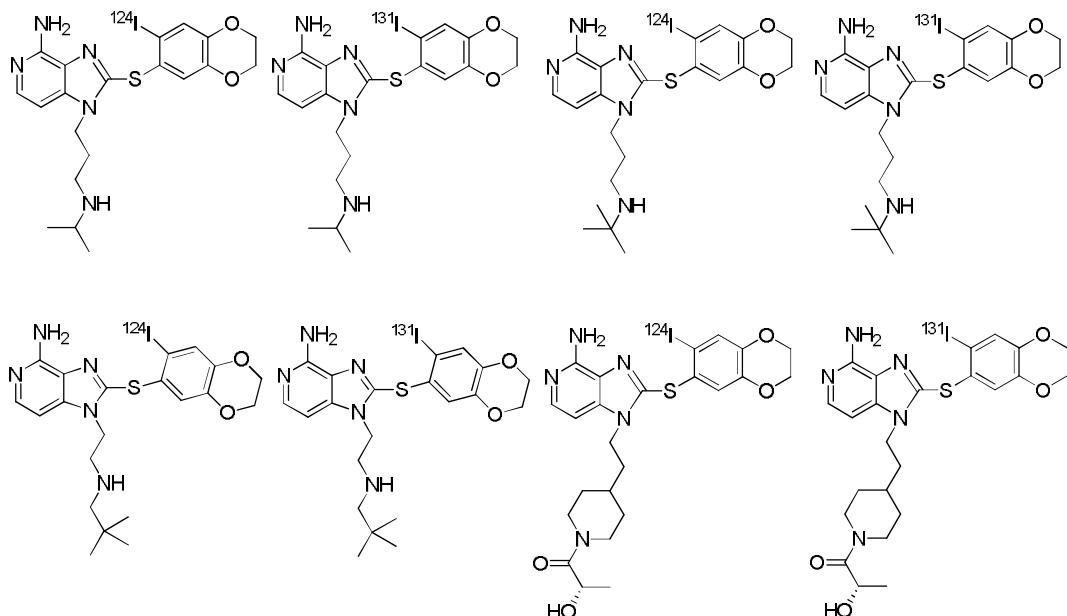
Todavía en otra modalidad, la sonda radioetiquetada se selecciona de un compuesto que tiene las siguientes fórmulas:



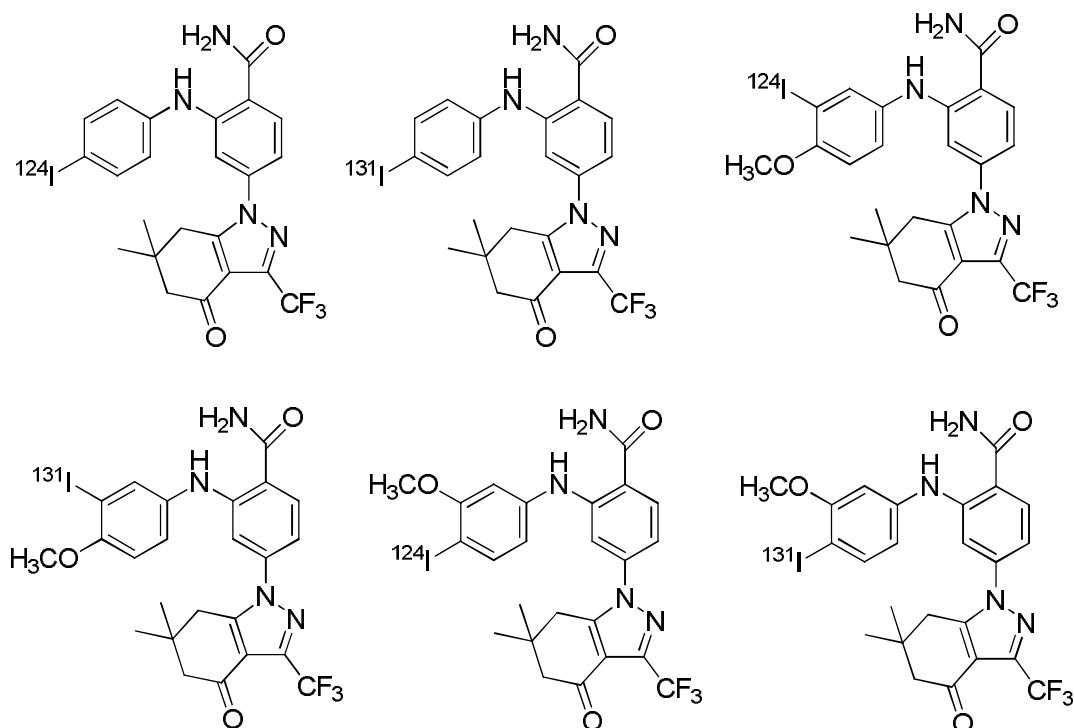


Todavía en otra modalidad, la sonda radioetiquetada se selecciona de un compuesto que tiene las siguientes fórmulas:





Todavía en otra modalidad, la sonda radioetiquetada se selecciona de un compuesto que tiene las siguientes fórmulas:



- 5 Los métodos para sintetizar los radiotrazadores en las modalidades de arriba pueden encontrarse por ejemplo en la Patente de E.U.A. No. 7.834.181, WO 2011/044394, WO 2008/005937 y Solicitud de PCT PCT/US2012/032371.

Los ejemplos específicos de sondas radioetiquetadas se describen en las Secciones 5.2.2.2.1. y 5.2.2.2.2.

5.2.2.2. Utilización de Sondas Radioetiquetadas en el Tratamiento del Cáncer

- 10 Para medir no invasivamente la expresión de las especies de HSP90 tumoral (“HSP90 oncoatómica”), determinar la dependencia del tumor de HSP90 y evaluar la inhibición objetiva, se usa un ensayo de tomografía de emisión de positrones (PET), que se basa en los inhibidores específicos de HSP90 que se ligan selectivamente a la “HSP90 oncoatómica” en las células cancerosas. Por una variedad de razones de peso, la tomografía de emisión de positrones (PET) es bien adecuada para medir la farmacocinética y retención del fármaco en el tumor en los

pacientes individuales¹¹⁰⁻¹¹³. La PET es un método cuantitativo con mayor resolución y sensibilidad en comparación con otras formas de diagnóstico por imágenes nuclear. Permite la formación de imágenes tridimensionales no invasiva produciendo estimaciones confiables de concentraciones de tejido (*por ejemplo* μCi o porcentaje de la dosis inyectada por gramo (%ID)) de un compuesto radioetiquetado administrado en tumores y órganos normales, sin considerar su profundidad en el cuerpo¹¹⁰⁻¹¹³. La PET puede por lo tanto proporcionar captación, concentración y eliminación del tumor espacial y temporalmente resuelta, así como distribución del trazador en todo el cuerpo. Puesto que la PET no proporciona necesariamente información anatómica detalla, el ensayo de PET se combina frecuentemente con una exploración CAT. La exploración CAT proporciona una vista exhaustiva de la anatomía estructural del cuerpo. Las imágenes de la exploración PET se puede superponer sobre la exploración CAT para determinar exactamente dónde va en el cuerpo el inhibidor radioetiquetado. El uso combinado de la exploración PET y exploración CAT se referirá en la presente como PET/CT.

Los métodos de detección y cuantificación diferentes a la PET también se pueden usar. En una modalidad, los trazadores de información de imágenes SPECT (Tomografía Computarizada de Emisión de Fotones Individuales), tal como yodo 131, yodo 123 y yodo 125 se pueden usar. En modalidades particulares, ¹³¹I-PU-H71, ¹²³I-PU-H71 o ¹²⁵I-PU-H7 se pueden usar como inhibidores radioetiquetados para la formación de imágenes SPECT.

Los métodos de la presente descripción son aplicables a cualquier tumor que puede detectarse mediante diagnóstico por imágenes con la aplicabilidad más clara para tumores sólidos y líquidos o linfomas. Ejemplos de tales tumores son aquellos asociados con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, carcinoma de células basales, melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, un cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, neuroblastoma, cánceres gastrointestinales incluyendo tumores estromales gastrointestinales, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de la vesícula biliar, cáncer anal, tumores cerebrales incluyendo gliomas, linfomas incluyendo linfoma folicular y linfoma de células B grande difuso, leucemia, linfomas, mieloma múltiple, neoplasias mieloproliferativas y cánceres ginecológicos incluyendo cánceres de ovario, cervicales y de endometrio, particularmente cáncer de mama, cáncer gástrico o cáncer pancreático. Como se plantea a continuación los inventores muestran que la captación y exposición de tumores al inhibidor de HSP90 radioetiquetado (*por ejemplo*, ¹²⁴I-PU-H71) varía en una manera que es predictiva de la respuesta a la terapia de HSP90 y distinguirá a los pacientes que tengan probablemente ya sea una respuesta terapéutica favorable o desfavorable a PU-H71 u otras terapias de HSP90. Específicamente, los tumores que muestran una captación mínima y/o eliminación rápida del inhibidor de HSP90 radioetiquetado (*por ejemplo*, ¹²⁴I-PU-H71) puede ser inaccesible o resistente al PU-H71 o a otros inhibidores de HSP90. Como alternativa, tales tumores pueden no depender de la HSP90 para sobrevivir (*es decir*, baja abundancia de "HSP90 oncogénica"), haciendo la terapia de HSP90 inapropiada. A la inversa los tumores con altas captaciones y retención prolongada del inhibidor de HSP90 radioetiquetado (*por ejemplo*, que corresponde a las relaciones altas de tumor a sangre en los puntos de tiempo posteriores o AUC de tumor alta para el intervalo de 0 a 24 o 48h o más allá) se predecirá que serán más sensibles a la orientación por parte de los inhibidores de HSP90. La selección de pacientes se puede guiar adicionalmente si las dosis terapéuticas y los programas requeridos para lograr las concentraciones efectivas del tumor, como es predicho por la PET, darían por resultado toxicidades prohibitivas (*por ejemplo*, la dosis efectiva es más alta que la dosis tolerada máxima (MTD) o si 15 al 100% de la "HSP90 oncogénica" es ocupada solamente por dosis mayores que la MTD).

La abundancia del complejo oncogénico de HSP90 (*es decir*, "HSP90 oncogénica") como es medido por la captación del inhibidor radioetiquetado, es un reflejo de la sensibilidad del tumor a la inhibición de la HSP90. De esta manera, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción, la abundancia de "HSP90 oncogénica" en los tumores se usa como un biomarcador de respuesta a la inhibición de HSP90. Como se plantea en lo anterior, la PET permite estimaciones confiables, no invasivas de las concentraciones de tejido del compuesto radioetiquetado en tumores y órganos normales. El [¹²⁴I]-PU-H71 y otros inhibidores de HSP90 que se ligan de manera preferente a las especies de HSP90 oncogénicas de esta manera se pueden usar para medir su captación del tumor no invasivamente, una característica que permite, similarmente al uso descrito en lo anterior de PU-H71 fluorescentemente etiquetado, la cuantificación del "complejo oncogénico de HSP90". De esta manera, la captación del tumor alta del inhibidor radioetiquetado identificará a pacientes con tumores que es más probable que respondan a los inhibidores de HSP90. La acumulación de trazadores de PU-H71 en los tumores se cuantifica de la formación de imágenes de PET usando técnicas conocidas por las personas expertas en el campo. La acumulación del tumor del trazador de PU-H71 se puede cuantificar del análisis de las concentraciones de trazadores de tumor en un punto de tiempo individual o múltiples puntos de tiempo. La concentración de trazadores se refiere a la cantidad de trazador presente en un volumen particular del tejido. Existen varias formas matemáticas para la expresión de concentración de trazadores ampliamente conocida en el estado de la técnica como es conocido por las personas expertas en el campo. La cantidad del trazador y/o volumen del tejido se pueden expresar cada uno como una expresión de un valor de referencia. Por ejemplo, el valor de captación comúnmente usado estandarizado, SUV, expresa la cantidad del trazador como una fracción de la dosis de trazador total administrada al paciente; y expresa el volumen del tejido como una fracción de un valor de referencia corporal (*por ejemplo*, masa corporal o área superficial corporal).

En la presente descripción, los inventores muestran que los pacientes con cáncer muestran "avidez" variable (captación y retención) para inhibidores radioetiquetados que se ligan selectivamente a la "HSP90 oncogénica". Los pacientes con cáncer con tipos y etapas similares de cáncer pueden tener captaciones sustancialmente diferentes

del inhibidor radioetiquetado, lo cual indica diferentes niveles de implicación de la HSP90 en la supervivencia y proliferación de las células cancerosas. Como un ejemplo, doce pacientes con cáncer de mama se evaluaron por su captación de [¹²⁴I]-PU-H71 después de 24 horas. Los resultados de estos estudios se representan en la Figura 24. Cada barra en la gráfica indica el valor de captación estandarizado máximo (SUV_{max}) de [¹²⁴I]-PU-H71, como se determina a través de la PET. El SUV_{max} varía significativamente de paciente a paciente, lo cual indica las diferencias en la cantidad de "HSP90 oncogénica" en los tumores del paciente. Los pacientes con mayores valores de SUV_{max} es más probable que respondan a la terapia de inhibición de HSP90. Por ejemplo, los pacientes con un SUV_{max} de [¹²⁴I]-PU-H71 de aproximadamente 0.25 o mayor cuando se mide 24 horas después de la administración del radiotrazador son candidatos potenciales para la terapia de inhibición de HSP90. Los pacientes con un SUV_{max} de [¹²⁴I]-PU-H71 de aproximadamente 0.75 o mayor cuando se mide 24 horas después de la administración del compuesto son fuertes candidatos para la terapia de inhibición de HSP90. Los pacientes con un SUV_{max} de [¹²⁴I]-PU-H71 de aproximadamente 1.5 o mayor cuando se mide 24 horas después de la administración del compuesto son candidatos muy fuertes para la terapia de inhibición de HSP90.

Basado en los descubrimientos de los inventores de que los pacientes con cáncer muestran avidez variable para inhibidores de HSP90 particulares (es decir, aquellos que se ligan de manera preferente a la "HSP90 oncogénica"), los inhibidores de HSP90 radioetiquetados se pueden usar para distinguir a los pacientes que probablemente responderán a la terapia de inhibición de HSP90 de pacientes que probablemente no responderán. Por consiguiente, la presente descripción proporciona un método para determinar si un tumor probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende poner en contacto el tumor o una muestra que contiene células del tumor con un inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado que se liga de manera preferente a una forma específica del tumor de la HSP90 presente en un tumor o células tumorales, medir la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado ligado al tumor o las células tumorales en la muestra, y comparar la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado ligado al tumor o a las células tumorales en la muestra a una cantidad de referencia. Una mayor cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado ligado al tumor o a las células tumorales comparado con la cantidad de referencia indica que el tumor probablemente responderá al inhibidor de HSP90.

La medición de la cantidad del inhibidor de HSP90 etiquetado ligado al tumor o a las células tumorales se puede realizar en un número de diferentes formas. Por ejemplo, en una modalidad, como se plantea en lo anterior, el SUV_{max} (o SUV_{avg}) del compuesto radioetiquetado se calcula en un punto de tiempo particular. Por ejemplo, el SUV se puede calcular en un tiempo de 4 horas o más después de la administración del inhibidor radioetiquetado. En algunas modalidades, el SUV se puede calcular en un tiempo de 8 horas o más después de la administración del inhibidor radioetiquetado. En modalidades particulares, el SUV se puede calcular en un tiempo de 16 horas o más después de la administración del inhibidor radioetiquetado (*por ejemplo*, 16 horas, 20 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 192 horas). El SUV se puede calcular en un intervalo comprendido entre cualquiera de los dos valores anteriores, por ejemplo, en un tiempo que varía de 8 horas a 16 horas, de 16 horas a 24 horas, de 16 horas a 48 horas, etc.

El SUV se puede comparar con una cantidad de referencia del inhibidor de HSP90 etiquetado ligado a células normales. En una modalidad, el SUV de referencia puede ser un nivel promedio tomado de individuos sanos o de mediciones en las células normales y tejidos de pacientes con cáncer en una población de control en un punto de tiempo particular. Como se plantea en la Sección 5.1., las células normales tienen la "HSP90 oncogénica" mínima o nada en lo absoluto. Por consiguiente, la captación del inhibidor radioetiquetado específico para la "HSP90 oncogénica" en las células de individuos sanos o tejidos u órganos sanos de un paciente con cáncer es mínima. Se apreciará por una persona experta en el campo que se prefiere una medición en el momento en que el inhibidor etiquetado se ha eliminado de la circulación de la sangre. También se aprecia por una persona experta en el campo que la medición se puede llevar a cabo en cualquiera de los tejidos normales pero se prefieren aquellos que no están implicados en el metabolismo y eliminación del inhibidor etiquetado. En una modalidad, tal medición preferida es de una o más áreas como son seleccionadas del músculo esquelético, hueso o acumulación de sangre del corazón.

En otra modalidad, la captación máxima (es decir, SUV_{max}) del inhibidor radioetiquetado en el tumor de un paciente (referido en la presente como "SUV tumoral") se puede comparar con la captación del inhibidor radioetiquetado en las células sanas del paciente. Por ejemplo, en una modalidad, los datos SUV del tumor de un paciente tomados en un punto de tiempo particular se pueden comparar con el SUV de la sangre o áreas seleccionadas del hueso o del músculo del paciente. El término "SUV de sangre" se refiere al SUV promedio de los contenidos del corazón derivados del ensayo de PET. El término "SUV muscular" se refiere al SUV promedio del músculo esquelético del paciente derivado del ensayo de PET. El corazón y la musculatura esquelética se eligieron debido a que son representativos de la actividad "de fondo" que circunda los sitios del tumor.

Uso del Ensayo de PET Para Selección de Pacientes y Tratamiento

Los inventores han descubierto que en pacientes con tumores dependientes de HSP90, las relaciones de SUV de tumor:músculo y de tumor:sangre derivadas de la PET aumentan en una manera dependiente del tiempo después de la inyección o un inhibidor radioetiquetado que se liga específicamente a "HSP90 oncogénica" (*por ejemplo*, [¹²⁴I]-PU-H71). En estos pacientes, las relaciones de SUV de tumor:músculo y tumor:sangre son generalmente cercanas a 1:1 después de la inyección del inhibidor radioetiquetado y la relación se incrementa a través del tiempo. Los datos

derivados de PET en un número seleccionado de pacientes con varios tipos de tumores sólidos y tumores líquidos quienes responden a la terapia de inhibición de HSP90 se muestran en la **Figura 25**. Para cada paciente, el SUV tumoral máximo (SUV_{max}) y el SUV muscular promedio en múltiples tiempos después de la administración de [^{124}I]-PU-H71 se obtuvieron del ensayo de PET. La **Figura 25** muestra la relación de SUV de tumor:músculo promedio y los valores de desviación estándar para los pacientes con cáncer. La relación de SUV de tumor:músculo se incrementa de 0 a 48 horas.

Además de los tumores sólidos, el método permitió la formación de imágenes de tumores líquidos tal como es el caso de un paciente diagnosticado con linfoma en la zona marginal y etapa IV de leucemia linfocítica crónica quien presentó esplenomegalia masiva detectada mediante diagnóstico por imágenes por PU-PET.

10 Basado en esta acumulación de datos, los inventores determinaron que los pacientes con cáncer con relaciones de SUV de tumor:músculo y/o SUV de tumor:sangre mayores que 2 después de la administración de un inhibidor de HSP90 que se liga específicamente a "HSP90 oncogénica" es probable que respondan a la terapia de inhibición de HSP90. La relación se calcula de manera preferente en una o más veces más de 4 horas después de la administración del inhibidor radioetiquetado. Por ejemplo, la relación se puede calcular 8 horas, 16 horas, 24 horas o 48 horas después de la administración del inhibidor radioetiquetado. En modalidades particulares, una relación de SUV de tumor:músculo o tumor:sangre de 2.5 o mayor 24 horas después de la administración del inhibidor radioetiquetado indica que el paciente es probable que responda a la terapia de inhibición de HSP90. En otras modalidades, una relación de SUV de tumor:músculo o tumor:sangre de 4 o mayor 24 horas después de la administración del inhibidor radioetiquetado indica que el paciente es probable que responda a la terapia de inhibición de HSP90. En aún otra modalidad, una relación de SUV de tumor:músculo o tumor:sangre de 5 o mayor 24 horas después de la administración del inhibidor radioetiquetado indica que el paciente es probable que responda a la terapia de inhibición de HSP90. En estas modalidades, el SUV en el tumor es el SUV_{max} y el SUV en el músculo o sangre es el SUV promedio (es decir, SUV_{avg}).

25 En otra modalidad, la imagen de PET obtenida en el tumor se compara con el tejido sano (es decir, no canceroso) del paciente. De manera preferente, en esta modalidad, la exploración de PET de referencia se toma en el mismo órgano que el tumor. Por ejemplo, si el paciente tiene un tumor en la columna, el tumor de la columna se compara con los huesos normales de la columna. Si el tumor es dependiente de HSP90, una mayor concentración del inhibidor radioetiquetado se encontrará en el tumor que en el tejido sano. Las cantidades de inhibidor radioetiquetado se pueden determinar cuantitativamente usando la exploración de PET. Los valores de SUV para el tumor se pueden comparar con los valores de SUV para el tejido circundante sano en un punto de tiempo particular o en una pluralidad de puntos de tiempo después de la inyección del inhibidor radioetiquetado. Como alternativa, la imagen de PET del tumor y la imagen de PET del tejido sano se pueden comparar por inspección visual. Si el tumor retiene el inhibidor radioetiquetado, entonces, visualmente, en la formación de imágenes de PET, el tumor se "iluminará" y parecerá una "punto de concentración" (véase, por ejemplo **Figura 26** y **Figura 27**).

30 35 Los inventores han determinado que la presencia de un "punto de concentración" o "puntos de concentración" en tiempos particulares después de la administración del inhibidor radioetiquetado implica la participación de la HSP90 en el cáncer del paciente y proporciona una indicación de que el paciente será apto para la terapia de inhibición de HSP90. La presencia de puntos de concentración en la formación de imágenes de PET se determina de manera preferente al menos 1.5 hora después de la administración del inhibidor radioetiquetado. Por ejemplo, el punto de concentración se puede detectar 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 165 horas o 192 horas después de la administración del inhibidor radioetiquetado. La presencia de un punto de concentración se puede detectar en un intervalo comprendido entre cualquiera de los dos valores anteriores, por ejemplo, en un tiempo que varía de 2 horas a 4 horas, de 4 horas a 8 horas, de 16 horas a 24 horas, etc. La presencia de un punto de concentración en el tumor de un paciente en los puntos de tiempo menores que 2 horas no indica necesariamente que el paciente será un buen candidato para la terapia de inhibición de HSP90. Por ejemplo, la **Figura 26** (panel derecho) representa un PET/CT de [^{124}I]-PU-H71 de un paciente con linfoma de células del manto tomado 30 minutos después de la inyección de [^{124}I]-PU-H71. La exploración de PET muestra una visualización clara después de 30 minutos. Sin embargo, no se observó captación de [^{124}I]-PU-H71 en los tiempos posteriores (3.5 – 24 horas). Por consiguiente, el paciente no es un candidato probable para la terapia de HSP90.

40 45 50 55 60 El ensayo de PET de la presente descripción también se puede usar para determinar qué tumores sólidos metastásicos o primarios y tumores líquidos son más susceptibles a la terapia de inhibición de HSP90. Por ejemplo, la **Figura 27** muestra la PET/CT de [^{124}I]-PU-H71 del paciente con cáncer de mama recurrente en los dos ganglios linfáticos indicados (LN). Las imágenes de PET en los tiempos indicados posteriores a la inyección de [^{124}I]-PU-H71 se cuantificaron y los datos SUV obtenidos de [^{124}I]-PU-H71 se convirtieron a concentraciones de inhibidor de HSP90 para una dosis administrada hipotética de PU-H71 de $10\text{mg}/\text{m}^2$. La exposición de los dos tumores al PU-H71 a través del tiempo de 0 a 24 horas también se calculó y se presentó como el área bajo la curva (AUC). En el panel inferior de la **Figura 27**, las imágenes transaxiales CT (izquierda), PU-PET/CT (intermedia), y fusión FDG-PET/CT (derecha) muestran avidez de [^{124}I]-PU-H71 en uno de los ganglios linfáticos pero no en el otro, la formación de imágenes de PU-PET es 24h posterior a la inyección de [^{124}I]-PU-H71. Interesantemente, la avidez de PU no se superpone con la avidez de FDG en este caso. Esto no es un caso único, y en varios de los pacientes analizados la avidez de FDG y PU se correlaciona para algunos tumores pero no todos. La ubicación de los tumores se indica por las flechas. Las imágenes de PET en los tiempos indicados después de la inyección de [^{124}I]-PU-H71 se midieron

como Valores de Captación Estandarizados Máximos (SUV_{max}). Los resultados del ensayo de PET indican que el ganglio linfático del ángulo traqueobronquial izquierdo se espera que sea más susceptible a la terapia de inhibición de HSP90 que la lesión de ganglio linfático del ángulo anterior traqueobronquial izquierdo.

- 5 En otro aspecto, los pacientes que se identifican por ser candidatos para la terapia de HSP90 se tratan con una cantidad farmacéuticamente efectiva de un inhibidor de HSP90. Los inventores han determinado que los pacientes con cáncer que se determina que son candidatos para la terapia de inhibición de HSP90 responden altamente favorable para la terapia de inhibición de HSP90. Si un paciente tiene múltiples tumores, entonces solo aquellos tumores con una avidez suficiente para el inhibidor de HSP90 radioetiquetado se espera que respondan a la terapia de inhibición de HSP90. Por ejemplo, la **Figura 28** muestra la imagen obtenida para un paciente con cáncer de mama de 48 años de edad con metástasis de pulmón y huesos a quien se le tomó una imagen con [¹²⁴I]-PU-H71 y luego se trató con un inhibidor de HSP90. Específicamente, cuando al paciente se le tomó una imagen con [¹²⁴I]-PU-H71 PET, la exploración mostró la HSP90 dirigida en la metástasis de pulmón derecho dominante pero no en la metástasis de la columna. Cuando el paciente recibió la terapia de HSP90 con STA9090 (ganetespib), un inhibidor de HSP90 químicamente distinto del PU-H71, la respuesta parcial temprana se demostró por los estudios de PET-CT de FDG en la masa del pulmón pero no en la lesión de la médula (**Figura 28**), de acuerdo con la predicción por la PET de [¹²⁴I]-PU-H71. Se obtuvieron resultados similares en pacientes con linfoma, cáncer pancreático y pacientes con neuroblastoma.
- 10
- 15

Uso del Ensayo de PET para la Determinación de la Dosificación

- 20 La presente descripción proporciona métodos para determinar una dosis efectiva y la frecuencia de administración para la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende administrar al paciente una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 que se liga de manera preferente a una forma específica del tumor de la HSP90 presente en un tumor o células tumorales, medir la captación de la forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 por el tumor del paciente en uno o más puntos de tiempo, y calcular la dosis y frecuencia de administración necesaria para mantener en el tumor en cada punto de tiempo una concentración del inhibidor de HSP90 efectiva para tratar el tumor. La captación de la forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 se puede determinar usando un ensayo de PET, como se plantea en lo anterior. La metodología se puede aplicar a numerosos tipos de tumores sólidos y líquidos incluyendo pero no limitado a cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, carcinoma de células basales, melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, un cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, neuroblastoma, cánceres gastrointestinales, que incluye tumores estromales gastrointestinales, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de la vesícula biliar, cáncer anal, tumores cerebrales incluyendo gliomas, linfomas, que incluyen linfoma folicular y linfoma de células B grande difuso, leucemias, melanomas y neoplasias mieloproliferativas y cánceres ginecológicos incluyendo cánceres de ovario, cervicales y de endometrio.
- 25
- 30

- 35 En una modalidad de la descripción, el SUV del inhibidor radioetiquetado derivado de PET se puede convertir a concentraciones molares del fármaco en el tumor de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$[\text{Inhibidor de HSP90}_{\text{tumor}}]_t = \text{Inhibidor de HSP90 (dosis)} \times \frac{[A_{\text{tumor}}]_t}{100\%} \times \frac{1}{W} \times \frac{1}{MW}$$

- 40 En la ecuación anterior, [inhibidor de HSP90]_t es la concentración molar del inhibidor en el tumor en un tiempo t después de la inyección del inhibidor radioetiquetado. El término inhibidor de HSP90 (dosis) es la dosis terapéutica inyectada. El término W es el espacio de agua del tumor. El término MW es el peso molecular del fármaco inyectado. El término [A_{tumor}]_t es el % de dosis radioetiquetada inyectada en el tumor en el tiempo t, un valor obtenido del SUV obtenido de la imagen de PET. Específicamente, el término [A_{tumor}] se puede derivar del SUV en el tumor (SUV_{tumor}) por la siguiente ecuación:

$$[A_{\text{tumor}}]/100\% = \text{SUV}_{\text{tumor}} / [\text{peso corporal(g)}]$$

- 45 En la ecuación anterior, [peso corporal] se refiere al peso corporal del paciente.
- 50 En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para determinar la concentración de un inhibidor de HSP90 presente en un tumor detectado mediante diagnóstico por imágenes en un paciente con cáncer. Una solución del inhibidor radioetiquetado (también referido en la presente como un fármaco "caliente") se puede inyectar en el paciente sin la inyección concomitante del fármaco (es decir, forma no radioetiquetada del fármaco, también referido en la presente como el fármaco "frío"). En tales casos, la concentración del fármaco [inhibidor de HSP90]_t se puede determinar usando la ecuación anterior. En una modalidad, el inhibidor radioetiquetado ("fármaco caliente") es la forma etiquetada del fármaco inyectado ("fármaco frío"). Por ejemplo, el inhibidor radioetiquetado puede ser [¹²⁴I]-PU-H71 y el fármaco administrado puede ser PU-H71. En otra modalidad, el inhibidor radioetiquetado puede ser diferente que el fármaco inyectado. La determinación de la concentración del fármaco en el tumor [inhibidor de HSP90]_t se puede determinar en un solo punto de tiempo o una pluralidad de puntos de tiempo después de la inyección del inhibidor radioetiquetado y el fármaco terapéutico. Al comparar la concentración del fármaco en el tumor [inhibidor de HSP90]_t con dosis eficaces conocidas obtenidas de los estudios preclínicos (por ejemplo, concentraciones semiinhibidoras (IC₅₀)), se puede determinar si la dosis administrada será eficaz. Por consiguiente, un doctor luego puede ajustar la dosis para asegurar que la cantidad
- 55

deseada del fármaco esté en el tumor.

En la modalidad donde el inhibidor radioetiquetado es la forma radioetiquetada del fármaco que se administrará al paciente, la concentración del fármaco en el tumor [$\text{inhibidor de HSP90}_{\text{tumor}}$]t se puede determinar sin administrar el fármaco frío. En tales casos, después de la determinación de [A_{tumor}]t del ensayo de PET, diferentes valores de dosis inyectada hipotética (D) se puede ingresar en la ecuación anterior para determinar la concentración del fármaco en el [$\text{Inhibidor de HSP90}_{\text{tumoral}}$]t del tumor. Una dosis efectiva por consiguiente se puede determinar al comparar la concentración del fármaco en el [$\text{Inhibidor de HSP90}_{\text{tumoral}}$]t del tumor con dosis eficaces conocidas obtenidas de estudios preclínicos como se plantea en lo anterior. Por otra parte, como se plantea con detalle en la Sección 5.2.1.2.1., la metodología se puede usar para diseñar un régimen de dosificación eficaz para la terapia de HSP90.

Los inventores han determinado que los cálculos de la concentración de tumor o exposición al fármaco (*por ejemplo*, AUC) después de la administración de solo el fármaco caliente y al ingresar la cantidad hipotética del inhibidor de HSP90 proporcionan resultados similares a los experimentos en los cuales el fármaco frío y caliente se coadministran. Como un ejemplo, la **Figura 29** muestra la concentración de PU-H71 en un ganglio paratraqueal enfermo a través del tiempo de la formación de imágenes (0-72h) como es obtenido por los dos métodos. Las concentraciones tumorales notablemente similares y de esta manera la exposición del tumor a PU-H71 se mide por los dos métodos (AUC_{0-48h} 24.9 vs. 22.3 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$).

La presente descripción también proporciona métodos para determinar la dosis de un inhibidor de HSP90 que es necesario para saturar los receptores de HSP90 oncogénica en el tumor. Como se describe en lo anterior, el ensayo de PET se puede realizar al coinjectar un inhibidor de HSP90 radioetiquetado (*es decir*, fármaco caliente) y una cantidad específica del fármaco terapéutico (*es decir*, fármaco frío). Si la dosis del fármaco inyectado es suficientemente alta para ocupar la mayoría o toda la “HSP90 oncogénica” en el tumor, entonces la captación del inhibidor radioetiquetado se suprime. El punto en el cual la captación del inhibidor radioetiquetado se suprime se puede usar para determinar la dosis de saturación objetivo del inhibidor, que también podría ser la “dosis tumoral máxima” que una sola dosis del fármaco puede suministrar o la dosis individual máximamente efectiva del fármaco. Como se muestra en la Ecuación (4) de la Sección 5.2.2.2.1., a continuación, el número de sitios de tumor ocupados por el inhibidor de HSP90 se puede calcular y convertir a un porcentaje de ocupación. Si el inhibidor de HSP90 se administra en una cantidad que se aproxima a la ocupación completa de los sitios de HSP90, el fármaco adicional no se esperaría que proporcione niveles incrementados de eficacia. Por consiguiente, la metodología proporciona un medio para determinar una dosis del inhibidor que puede ocupar la mayor parte o todo de la HSP90 oncogénica en el tumor. Como se plantea con más detalle en la Sección 5.2.2.2.1., la metodología descrita en lo anterior proporciona una estrategia de dosificación más racional y efectiva que se basa en la concentración de tumor máximamente efectiva derivada de PET en lugar de la dosis tolerada máxima convencional (MTD). El procedimiento evita la escalada de la dosis y limita los problemas toxicológicos asociados con el fármaco.

5.2.2.2.1. [^{124}I]-PU-H71

En un aspecto de la presente descripción, el inhibidor de HSP90 radioetiquetado que se emplea para la formación de imágenes de PET es una forma radioetiquetada de PU-H71, tal como [^{124}I]-PU-H71. Como se plantea en lo anterior, la formación de imágenes de PET con [^{124}I]-PU-H71 se puede usar para informar a los doctores si los pacientes con cáncer serán susceptibles a la terapia de HSP90. Por otra parte, los resultados obtenidos de la formación de imágenes de PET con [^{124}I]-PU-H71 se pueden usar para determinar la dosis de un inhibidor de HSP90 que se debe administrar a un paciente con cáncer particular. Adicionalmente, los resultados obtenidos de la formación de imágenes de PET con [^{124}I]-PU-H71 se pueden usar para determinar un programa de dosificación de un inhibidor de HSP90. El inhibidor de HSP90 que se administra como terapia es PU-H71 o un análogo, homólogo o derivado de PU-H71.

Ensayo de PET de [^{124}I]-PU-H71 como un Ensayo de HSP90 tumoral no invasivo potencial

La introducción de PET para el ensayo no invasivo de inhibidores de HSP90 es factible debido a que uno de los inhibidores de HSP90, PU-H71, contiene un átomo de yodo endógeno, el yodo-127 (^{127}I) de isótopo estable de origen natural (**Figura 30a**)¹¹⁴. Este se puede sustituir isotópicamente para la PET con el yodo-124 (^{124}I), emisor de positrones de larga vida, un isótopo con una vida media física de cuatro días (**Figura 30a**). Tal etiquetado isotópico no cambia la afinidad, selectividad o perfil de biodistribución de este compuesto. De hecho, la PET radiofarmacéutico, [^{124}I]-PU-H71, es la misma molécula que el compuesto terapéutico, PU-H71, y por lo tanto debe predecir su farmacocinética. Una administración individual de cantidades residuales (microgramos) de fármaco radioetiquetado también es completamente no perturbador biológicamente, y permite una formación de imágenes de PET en serie para supervisar las concentraciones del trazador de tejido durante múltiples días.

La vida media relativamente prolongada de ^{124}I es ideal para supervisar la farmacocinética del tumor prolongada reportada de los inhibidores de HSP90 debido a que permite una formación de imágenes de PET cuantitativa, satisfactoria por hasta una semana después de la administración. Además, ^{124}I ahora está comercialmente disponible en los Estados Unidos, y su vida media asegura que [^{124}I]-PU-H71 puede estar disponible en los centros médicos en todo el mundo.

Por consiguiente, el [¹²⁴I]-PU-H71 es adecuado para el uso como un “trazador” real de PU-H71 y como un biomarcador objetivo para otros inhibidores de HSP90.

Los inhibidores de HSP90 son una clase prometedora de terapia dirigida al cáncer, pero su desarrollo clínico óptimo requiere el codesarrollo de ensayos farmacométricos específicos al objetivo HSP90. Debido a su yodo endógeno, los inventores usan el inhibidor de HSP90 PU-H71 para desarrollar un ensayo de formación de imágenes no invasivo del primero de su clase para la HSP90 tumoral basado en la tomografía de emisión de positrones. Los inventores muestran en los modelos de ratón del cáncer de mama que el [¹²⁴I]-PU-H71 es un trazador real para la farmacocinética intratumoral y la farmacodinámica del fármaco precursor. Los inventores muestran su uso en la determinación de la dosis del inhibidor de HSP90 necesaria para lograr concentraciones tumorales efectivas, en el ensayo de la concentración real del fármaco administrado al tumor y en el diseño de una dosis eficaz y régimen de dosificación. El ensayo también informa en una dosis de saturación de objetivo tumoral, que promete realizar la terapia de HSP90 más allá de la dosis tolerada máxima convencional. Basado en este trabajo, los inventores proponen que el ensayo proporcionará a los médicos una capacidad mejorada para el enriquecimiento de los ensayos y para adaptar la dosificación y programa de administración de fármacos al paciente individual, prometiendo llenar una necesidad clínica no cumplidas e impactar positivamente la decisión clínica con los agentes dirigidos a HSP90.

La biodistribución y eliminación de [¹²⁴I]-PU-H71 refleja aquellas de PU-H71

Para evaluar el uso de [¹²⁴I]-PU-H71 en la predicción y supervisión del perfil cinético *in vivo* de PU-H71 y otros inhibidores de HSP90, los inventores han producido [¹²⁴I]-PU-H71 y han llevado a cabo estudios de formación de imágenes de PET de animales pequeños en serie de ratones portadores de tumor (xenoinjertos MDA-MB-468 de cáncer de mama humano), derivando las curvas de tiempo-actividad (es decir % de ID/g contra el tiempo posterior a la administración) para tumores y varios tejidos normales. Los estudios de biodistribución corroborativos de [¹³¹I]-PU-H71 o [¹²⁴I]-PU-H71 se llevaron a cabo al sacrificar los cohortes de animales en tiempos seleccionados posteriores a la inyección y cosechando y haciendo un conteo gama de los tumores y los tejidos normales seleccionados (**Figuras 30b-c**). Despues de la administración intravenosa (i.v.) o intraperitoneal (i.p.), el agente se distribuyó rápidamente a los tejidos (**Figura 30b**; 1-2h), con la eliminación rápida subsecuente de la sangre y otros tejidos normales. (**Figura 30b**; 4 a 100h). Cuatro horas después de la administración (p.a.), estuvo presente en 40, 9, 18, 6 y 10 veces las concentraciones más altas en el tumor que el cerebro, hueso, músculo, bazo y corazón, respectivamente (**Figura 30c**). A las 24h, las relaciones de tejido tumoral a normal se incrementaron de 50 a 100 para el cerebro, músculo, bazo, corazón y sangre. Las captaciones (% de ID/g) en tumores tanto más pequeños (~100 mm³ en volumen) como más grandes (~200 mm³ en volumen) fueron similares (**Figura 30d**).

El [¹²⁴I]-PU-H71 se eliminó de los tumores en una forma biexponencial (**Figura 30d**). Una fase rápida inicial, atribuida a la eliminación de la actividad que lleva sangre (**Figuras 30b, 30d**), se siguió por una fase de eliminación terminal (tiempo medio ~ 60 h) atribuible a la retención tumoral específica (**Figura 30d, recuadro**), consistente con los datos farmacocinéticos de tumor basados en espectro de masas de cromatografía líquida en tandem (LC-MS/MS) previamente reportados para el PU-H71^{100,115-118}. Estos datos soportan el concepto de que dentro del tumor, las formas terapéuticas y de radiotrazador del fármaco se comportan idénticamente.

En contraste a los tumores, [¹²⁴I]-PUH71 se eliminó rápidamente de cuerpo total en una forma monoexponencial, sin evidencia de ligación a proteínas en plasma (**Figuras 30b-30d**). La excreción de [¹²⁴I]-PU-H71 se presentó a través de las vías hepatobiliarias y urinarias (**Figuras 30b**). La actividad hepática se eliminó más lentamente que la actividad de cuerpo total, presumiblemente debido al metabolismo del fármaco hepático y la excreción hepatobiliar. La actividad en la región hepática probablemente representó tanto el trazador intacto como los metabolitos en el árbol biliar y no el [¹²⁴I]-PU-H71 en los hepatocitos, consistente con los descubrimientos previamente reportados de que el PU-H71 intacto desaparece rápidamente del hígado de ratón^{100,117}. La actividad del tacto gastrointestinal representó más de 50% de la actividad administrada (**Figura 30b**) pero fue casi la actividad completamente excretada (no mostrada).

La actividad en los órganos no gastrointestinales y no genitourinarios (es decir, los riñones, uréteres y vejiga urinaria) representaron ~1% de la actividad administrada. El 49% restante (50% en los órganos gastrointestinales menos 1% en los órganos genitourinarios) se excretaron probablemente a través del tracto urinario. Esta observación es soportada por los datos de [¹²⁴I]-PU-H71 PET *in vivo* de 4 horas (**Figura 30b**) derivados usando una región de interés (ROI) que circscribe el ratón completo y representa solamente 40-50% de la actividad administrada. Debido a que el tránsito intestinal en los ratones es usualmente más prolongado que 4h¹¹⁹, es probable que el resto de la actividad administrada (es decir, el 40-50% no en el ROI de cuerpo completo de 4 horas) se excretó por la vía de tracto urinario.

La radioactividad se visualizó en la región de la tiroideas que se suprimió si los ratones recibieron una dosis de saturación de yodo de potasio antes de la administración de radiotrazador (**Figura 30b**), indicando la producción de radioyodo libre (es decir, radio-yodo) *in vivo*. En los ratones que no recibieron yodo de potasio, la actividad de la tiroideas máxima entre 4 y 28 horas posterior a la inyección fue <0.4% de la actividad administrada. La tiroideas de ratón normal acumula hasta ~4-7% de radioyodo administrado^{120,121}. De esta manera, una captación de la tiroideas de <0.4% sugiere que la cantidad de radioyodo libre liberado *in vivo* de [¹²⁴I]-PU-H71 es pequeña (~5-10% de la

actividad administrada). La liberación de una cantidad pequeña de radioyodo libre no es poco común para los trazadores radioyodados, y en la práctica clínica, la captación de la tiroides se bloquea de manera rutinaria y efectivamente usando la administración oral de una solución saturada de yodo de potasio antes de la administración del radiotrazador.

5 ***[¹²⁴I]-PU-H71 permite la visualización de HSP90 tumoral clara por PET***

La formación de imágenes de PET *in vivo* de [¹²⁴I]-PU-H71 en los ratones que llevan un tumor proporcionan una visualización de tumor clara, y de esta manera una orientación de HSP90 tumoral potencial y retención de tumor de 2 horas posterior a la inyección (**Figura 30b**, flechas). Los valores de captación medios (desviación + estándar) (%) de ID/g obtenidos del análisis ROI fueron 0.35 ± 0.07, 0.083 ± 0.02, 0.058 ± 0.02, 0.031 ± 0.01 y 0.024 ± 0.008 a 4, 10 24, 48, 72 y 100 horas respectivamente, consistente con los valores obtenidos en los estudios de biodistribución (**Figura 30d**), confirmando que la supervisión no invasiva del PU-H71 *in vivo* y la cuantificación confiable de su concentración tumoral dependiente del tiempo es posiblemente por la PET de [¹²⁴I]-PU-H71.

Uso de la formación de imágenes de PET de [¹²⁴I]-PU-H71 para determinar la dosis del PU-H71 necesaria para lograr una concentración tumoral de PU-H71 farmacológicamente efectiva

15 Como se indica en lo anterior, la farmacocinética de [¹²⁴I]-PU-H71, y por lo tanto el PU-H71 no etiquetado, en el tumor y en la sangre son concentraciones de fármaco tumorales notablemente diferentes estabilizadas por ~24 horas posterior a la inyección después de una eliminación exponencial rápida inicial atribuible en gran medida a la eliminación del fármaco de la acumulación de sangre tumoral. Los niveles de fármaco en la sangre, en contraste, mostraron una eliminación exponencial rápida y continua (**Figuras 30b, 30d**). Las relaciones de concentración de la actividad de tumor a sangre de [¹²⁴I]-PU-H71 alcanzaron valores de ~10 y mayores ~12 h después de la inyección (Figura 30c). De esta manera los niveles de sangre integrados de PU-H71 (es decir, el área bajo la curva de concentración del tiempo-actividad en la sangre, AUC_{sangre}^{PU-H71}) no fueron sustitutos confiables de los niveles tumorales de PU-H71. De hecho, el área bajo la curva de la concentración de tiempo-actividad de tumor, AUC_{tumor}^{PU-H71}, es de 15 veces más grande que la AUC_{sangre}^{PU-H71} (**Figura 30d**, 11.4 contra 0.78% de ID/g-h para el tumor y la sangre, respectivamente). La farmacocinética de la sangre por lo tanto no es confiable para diseñar un régimen de dosificación para lograr una concentración tumoral terapéuticamente efectiva específica para el paciente.

20 Por lo tanto los inventores investigaron la capacidad de la PET de [¹²⁴I]-PU-H71 para predecir la dosis de PU-H71 administrada requerida para lograr y mantener una concentración tumoral terapéuticamente efectiva durante un período de tiempo seleccionado. Para una dosis administrada de PU-H71 (PU-H71_{dosis} en mg), la concentración de fármaco (mg/mL o g/L) en el espacio de agua del tumor (usando un espacio de agua promedio, W = 0.8 mL/g) en un tiempo *t* posterior a la administración, [PUH71_{tumor}]_t, se calcula de la concentración de la actividad del [¹²⁴I]-PU-H71 derivado de PET en el tumor (en % de ID/g), [A_{tumor}]_t, en equilibrio y lograda en el tiempo *t* posterior a la administración:

$$[\text{PU-H71}_{\text{tumor}}]_t = \text{PU-H71}_{\text{dosis}} \cdot \frac{[\text{A}_{\text{tumor}}]_t}{100\%} \cdot \frac{1}{W} \quad (1)$$

35 La concentración de fármaco (en μM) en el espacio de agua del tumor, [PU-H71_{tumor}] en el tiempo *t* posterior a la administración, es por lo tanto:

$$[\text{PU-H71}_{\text{tumor}}]_t = \text{PU-H71}_{\text{dosis}} \cdot \frac{[\text{A}_{\text{tumor}}]_t}{100\%} \cdot \frac{1}{0.8} \cdot \frac{1 \times 10^6}{512} \mu\text{M} \quad (1a)$$

donde el factor 512 es el peso molecular de PU-H71 y el factor 1x10⁶ convierte la concentración a μM.

$$\text{PU-H71}_{\text{dosis}} = [\text{PU-H71}_{\text{tumor}}]_t \cdot 0.8 \cdot \frac{100\%}{[\text{A}_{\text{tumor}}]_t} \cdot \frac{512}{1 \times 10^6} \quad (2)$$

40 A la inversa, para lograr una concentración de PU-H71 tumoral terapéuticamente efectiva seleccionada, la dosis requerida de PU-H71 para administrar (en mg) para un paciente individual se puede calcular con base en su concentración de actividad derivada de PET en el tumor en el tiempo *t* posterior a la administración:

45 Usando los datos de tumor-actividad en la **Figura 30d**, la ecuación (1a) se empleó para calcular las concentraciones de PU-H71 dependientes del tiempo en el tumor de 0 a 160 horas posterior a la administración (p.a.) para las dosis administradas de 1, 5, 25, 50 y 75 mg/kg de PU-H71 (0.02, 0.1, 0.5, 1 y 1.5 mg para un ratón de 20 gramos) (**Figura 31a**, panel *inferior*). A partir de los estudios preclínicos con el PU-H71 en células cancerosas establecidas se sabe que una exposición de 72 horas de varias células cancerosas de mama establecidas al inhibidor de HSP90 conduce a la inhibición del crecimiento celular con concentraciones semiinhibidoras registradas (IC₅₀) de 0.05 a 0.25 μM, dependiendo del tipo de célula¹⁰⁰. De esta manera, una sola dosis, en cada uno de los niveles de dosis anteriores, 50 se predijo por la PET de [¹²⁴I]-PU-H71 para lograr concentraciones terapéuticamente efectivas en el tumor a través

de 72 horas p.a. (**Figura 31a, panel superior**). Para las dosis administradas de PU-H71 de 5, 25, 50 y 75 mg/kg y un valor $[A_{tumor}]_{t=24h}$ de $\sim 14\pm 0.05\%$ de ID/g (**Figura 31d**), la ecuación (1a) produce las concentraciones tumorales del PU-H71 de 0.37, 1.83, 3.67 y 5.51 μM , respectivamente, consistentes con las concentraciones medidas en estos tumores por LC-MS/MS (**Figura 31b** y no mostrados). Una dosis de 1 mg/kg produce concentraciones tumorales 5 menores de 0.05 μM a las 48 horas y más allá (**Figura 31a**) y tal vez de esta manera, representa el límite inferior para una dosis terapéuticamente efectiva en este modelo de tumor.

La PET de [¹²⁴I]-PU-H71 predice con precisión la administración de concentraciones de PUH71 terapéuticamente efectivas en el tumor

Para validar que la PET predijo con precisión las concentraciones tumorales logradas después de la inyección de 5 a 10 75 mg/kg de PU-H71, y que estas concentraciones fueron terapéuticamente efectivas *in vivo*, los inventores investigaron los efectos farmacodinámicos asociados con estas dosis (**Figuras 31c, 31d**). De acuerdo con los descubrimientos anteriores que sugieren la administración de la concentración tumoral farmacológicamente efectiva 15 de PU-H71, la administración de dosis de PU-H71 de 5 a 75 mg/kg a ratones que llevan tumores MDA-MB-468 condujeron a la regulación por decremento y/o inhibición de Akt y Raf-1 y la inducción de la apoptosis, como es evidenciado por la escisión de PARP (**Figura 31c, In vivo**). Estos cambios farmacodinámicos son similares a aquellos observados en el cultivo de tejido, donde la exposición de células MDA-MB-468 durante 24 horas a 20 concentraciones de PU-H71 arriba de 0.1 μM dio por resultado la inhibición de HSP90, como es mostrado por un agotamiento dependiente de la dosis de oncoproteínas dependientes de HSP90 (es decir, Raf-1, Akt) (Referencia 100 y la **Figura 31d, In vitro**). Las concentraciones semiinhibidoras determinadas *in vitro* que dan por resultado la degradación de oncoproteínas cliente ($EC_{50}^{\text{Raf-1}} = 0.13\pm 0.02 \mu\text{M}$ y $EC_{50}^{\text{Akt}} = 0.15\pm 0.02 \mu\text{M}$; **Figura 31d**) son similares a aquellas determinadas por la PET de [¹²⁴I]-PU-H71 en tumores y dan por resultado los efectos farmacodinámicos medidos ($EC_{50}^{\text{Raf-1}} = 0.24\pm 0.03 \mu\text{M}$ y $EC_{50}^{\text{Akt}} = 0.09\pm 0.08 \mu\text{M}$; **Figura 31c**).

Colectivamente, las concentraciones tumorales predichas por PET consistentes validadas por las mediciones LC-MS/MS y por lo análisis farmacodinámicos Western blot, muestran la capacidad y la precisión de los ensayos de PET de [¹²⁴I]-PU-H71 de informar la selección de la dosis administrada de este inhibidor de HSP90 requerida para 25 lograr una concentración tumoral terapéuticamente efectiva.

La dosis trazadora de [¹²⁴I]-PU-H71 predice con precisión las concentraciones tumorales de PU-H71 sobre un intervalo de dosis, hasta la saturación objetivo en tumores

30 La farmacocinética cantidades de microdosis del trazador de [¹²⁴I]-PU-H71 podrían no correlacionarse con aquella de las dosis terapéuticas macroscópicas. En dosis de PU-H71 altas, los factores tales como saturación objetivo de HSP90 en tumores, perfil de ligación a proteínas en plasma distinta o cambios en el metabolismo del fármaco debido a la inhibición potencial de las enzimas metabolizantes de hígado, también pueden alterar la farmacocinética del agente.

35 Por lo tanto los inventores examinaron si en la dosis de saturación potencial, las predicciones basadas en PET de la concentración de PU-H71 se correlacionan con aquellas determinadas experimentalmente por LC-MS/MS (**Figura 31b**). La administración de 75 mg/kg de PU-H71 a los tumores MDA-MB-468 da por resultado la regresión y curas del tumor¹⁰⁰, y de esta manera en esta dosis curativa, la saturación de la HSP90 tumoral objetivo o por lo menos la ocupación de un número terapéuticamente significativo de moléculas objetivo se logra presumiblemente. Con base 40 en las concentraciones tumorales derivadas de los estudios de PET de [¹²⁴I]-PU-H71 o estudios de biodistribución de [¹³¹I]-PU-H71, la administración a los ratones que llevan tumor de 75 mg/kg de inhibidor produjeron concentraciones tumorales de 5.51 ± 1.78 , 3.50 ± 0.27 , 2.18 ± 1.78 , 1.29 ± 0.29 y $0.69\pm 0.25 \mu\text{M}$ a 24, 48, 72, 96 y 120h posterior a la administración, respectivamente (**Figura 31b**). Estos valores están en buen acuerdo con las concentraciones tumorales de PU-H71 concretas medidas por LC-MS/MS (**Figura 31b, LC-MS/MS**), mostrando la confiabilidad de las predicciones del ensayo de PET sobre un intervalo de dosis hasta aquellas que dan por resultado una inhibición 45 objetivo máximamente efectiva (**Figura 31c**).

Uso de [¹²⁴I]-PU-H71 en la selección de pacientes para la terapia de HSP90

Además de proporcionar un procedimiento basado en PET clínicamente práctico para supervisar la biodistribución 50 de PU-H71 e informar la farmacocinética del tumor de PU-H71, los análisis anteriores sugieren un procedimiento para clasificación de pacientes, que distingue los pacientes que tendrán probablemente ya sea una respuesta terapéutica favorable o desfavorable a PU-H71 u otras terapias de HSP90.

Específicamente, los tumores que muestran captación mínima y/o eliminación rápida de [¹²⁴I]-PU-H71 pueden ser 55 inaccesibles a PU-H71 u otros inhibidores de HSP90. Como alternativa, tal descubrimiento también puede indicar que el tumor no depende de HSP90 para la supervivencia y de esta manera la terapia de HSP90 no es apropiada^{93,97}. A la inversa, los tumores con altas captaciones y retención prolongada de [¹²⁴I]-PU-H71 (*por ejemplo*, 60 que corresponden a las relaciones de tumor a sangre altas en puntos de tiempo posteriores, **Figura 30**) se predeciría que son más sensibles a fijar como objetivo los inhibidores de HSP90. La selección de pacientes se 65 puede guiar adicionalmente si la dosis terapéutica requerida para lograr las concentraciones tumorales efectivas, como es predicho por la PET de [¹²⁴I]-PU-H71, daría por resultado toxicidades prohibitivas (*por ejemplo*, la dosis

efectiva es más alta que la dosis tolerada máxima).

En conclusión, la capacidad del tumor de retener el inhibidor de HSP90 en una concentración efectiva durante un período de tiempo prolongado y para lograr tales concentraciones en dosis inhibidoras no tóxicas, son dos criterios claves para la entrada de la terapia de HSP90 que se pueden medir confiablemente por la PET de [¹²⁴I]-PU-H71.

5 ***Uso de microdosis de [¹²⁴I]-PU-H71 coinyectadas con PU-H71 de dosis terapéutica para someter a ensayo las concentraciones tumorales de PU-H71 por PET***

Aunque la PET de [¹²⁴I]-PU-H71 estima bien la dosis del inhibidor de HSP90 necesaria para dar por resultado concentraciones tumorales eficaces, los inventores investigaron si [¹²⁴I]-PU-H71 en cantidades residuales (~6.5 ng/g) coadministradas con cantidades terapéuticas de PU-H71 (5 mg/kg a 75 mg/kg o 5000 ng/g a 75.000 ng/g), podrían someter a ensayo con confiabilidad la cantidad de PU-H71 administrado esencialmente al tumor (**Figura 31b**, PET después de la coinyección de [¹²⁴I]-PU-H71 y PU-H71). La capacidad de medir la exposición a fármaco en los tejidos de la actividad del fármaco podría proporcionar información crítica para predecir la respuesta potencial (por ejemplo qué concentración se ha suministrado al tumor y si es suficiente para la respuesta farmacodinámica marcada). Las mediciones secuenciales a través del tiempo del tratamiento también se podrían usar como un indicador de si la biología tumoral, y de esta manera la respuesta, se ha alterado (por ejemplo una disminución en la concentración administrada al tumor podría indicar el desarrollo potencial de resistencia al inhibidor de HSP90).

Debido a que el radiotrazador [¹²⁴I]-PU-H71 y el PU-H71 no radiactivo se inyectan en una relación de ~1:10.000, los inventores asumen razonablemente que el último es esencialmente la única forma significativa del fármaco en el tumor. De esta manera, para una dosis coadministrada de PU-H71 (PU-H71_{dosis} en mg) y una cantidad residual de [¹²⁴I]-PU-H71, la concentración del fármaco en el espacio de agua del tumor (usando nuevamente un espacio de agua promedio, W = 0.8 mL/g y MW de 512), es:

$$[\text{PU-H71}_{\text{tumor}}] = \text{PU-H71}_{\text{dosis}} \frac{[\text{A}_{\text{tumor}}]_t}{100\%} \cdot 2.44 \times 10^3 \mu\text{M} \quad (3)$$

La resolución de la ecuación (3) para dosis de PU-H71 de 5, 25, 50 y 75 mg/kg (0.1, 0.5, 1 y 1.5 mg para un ratón de 20 g) produce las concentraciones tumorales concretas del inhibidor de HSP90 (**Figura 31b**, mostrada solamente para 75 mg/kg). Estos valores se correlacionan bien con las concentraciones tumorales de PU-H71 estimadas por la PET de [¹²⁴I]-PU-H71 y por las biodistribuciones del trazador [¹³¹I]-PU-H71 y validadas por el LC-MS/MS (**Figura 31b** y no mostradas).

Colectivamente, estos datos muestran que el ensayo de PET [¹²⁴I]-PU-H71 de microdosis puede producir tanto la dosis de PU-H71 necesaria para dar por resultado una concentración tumoral específica y la concentración del PU-H71 terapéutico administrado a un tumor.

30 ***Uso de [¹²⁴I]-PU-H71 para someter a ensayo la dosis tumoral máxima, la dosis que administra la saturación objetivo del tumor por un fármaco HSP90***

35 La PET de [¹²⁴I]-PU-H71 del [¹²⁴I]-PU-H71 coinyectado y PU-H71 podrían evaluar potencialmente la ocupación de los objetivos HSP90 tumorales por un inhibidor de HSP90. Por ejemplo, la demostración por PET que una dosis terapéutica administrada de inhibidor de HSP90 suprime completa o significativamente la captación de tumor de [¹²⁴I]-PU-H71, puede indicar que la dosis terapéutica ha saturado los objetivos HSP90 tumorales, y que la dosis administrada administra la “dosis tumoral máxima” que una sola dosis de fármaco puede administrar. Esta dosis de saturación objetivo también se puede referir como la dosis individual máximamente efectiva de fármaco.

40 Para investigar esta posibilidad, los inventores calcularon el número de sitios de HSP90 tumoral ocupados por el PU-H71 por gramo de tumor (sitios de HSP90/g tumor), para una dosis de trazador (~6.5 ng/g) de [¹²⁴I]-PU-H71 coadministrada con dosis terapéuticas (5 a 75 mg/kg o 5000 a 75.000 ng/g), PU-H71_{dosis}, de PU-H71. Esto se obtuvo usando la fórmula:

$$(\text{Hsp90 sítios/g tumor}) = \frac{[\text{A}_{\text{tumor}}]_t}{100\%} \cdot \text{PU-H71}_{\text{dosis}} \frac{1}{W} \text{ nmol/g} \quad (4)$$

45 La resolución de la ecuación (4) para las dosis coadministradas de las dosis no radiactivas de PUH71, PU-H71_{dosis}, de 5, 25, 50 y 75 mg/kg (5000, 25.000, 50.000 y 75.000 ng/g, respectivamente) produce el número de moléculas de PU-H71 (en nmol) ligadas por gramo de tumor. Debido a que una molécula de ligando ocupa la bolsa de y se liga a una molécula de HSP90^{97,109}, la ecuación (4) también produce el número de sitios de HSP90 tumoral (en nmol) ocupados por PU-H71/g tumor (**Figura 31e**).

El análisis de la curva de ligación a 24 horas posterior a la inyección sugiere que la ocupación de los sitios HSP90 disponibles es casi la saturación en un PU-H71_{dosis} de 75 mg/kg, con un gramo de tumor que contiene un máximo de 160.7×10^{-3} nmoles de HSP90 (**Figura 31e**, BMAX), que corresponde a 960×10^{11} de moléculas de HSP90. Usando este valor, los inventores después calcularon el porcentaje de los sitios de HSP90 tumoral ocupados por diferentes

5 dosis administradas de PU-H71 y determinaron que la administración de 5, 25, 50 y 75 mg/kg de PU-H71 dio por resultado 12.1, 57.7, 88.7 y 92.7% de los sitios de HSP90 tumoral disponibles, respectivamente, siendo ocupados por el inhibidor (**Figura 31f**). Con la saturación casi completa de la captación del tumor lograda por una sola dosis terapéutica de PU-H71 de 75 mg/kg, esa dosis ha ocupado la mayor parte de los sitios de HSP90 tumoral disponibles y por lo tanto incrementar más la dosis no se esperaría que diera por resultado cantidades 10 incrementadas de fármaco que se localiza en el tumor pero incrementaría la exposición al fármaco sistémica y la toxicidad potencial del paciente.

En resumen, el análisis de la “dosis tumoral máxima”, como se muestra aquí por la PET de [¹²⁴I]-PU-H71, proporciona información más valiosa en el diseño de ensayo que la “dosis tolerada máxima”. Específicamente indicaría una dosis que da por resultado una exposición máxima del tumor (no el cuerpo completo), para una sola 15 dosis administrada, conduciendo al mejor posible efecto antitumoral mientras que minimiza la toxicidad asociada con una sola dosis administrada. Adicionalmente, sugiere un nuevo procedimiento para la selección de la frecuencia de dosificación terapéutica, en donde una vez que la dosis tumoral máxima se ha identificado, la frecuencia de dosificación terapéutica se podría incrementar hasta un punto de valoración de la frecuencia tolerada máxima (antes que la dosis tolerada máxima convencional, MTD), maximizando de esta manera la exposición del tumor temporal.

20 ***Uso de PET de [¹²⁴I]-PU-H71 para diseñar un régimen de dosis eficaz para la terapia de HSP90***

Los resultados anteriores mostraron que la PET de [¹²⁴I]-PU-H71 se puede usar para predecir la dosis necesaria para lograr y mantener una concentración tumoral específica durante un período de tiempo seleccionado después de una sola administración de PU-H71. Debido a que los tumores muestran una retención prolongada de PU-H71, la administración repetida de PU-H71 en frecuencia suficiente daría por resultado potencialmente, con cada dosis sucesiva, concentraciones tumorales acumulativas más altas de PU-H71. Una concentración de PU-H71 tumoral de estado permanente, específica de la dosificación y programa usado, se lograría eventualmente. Por consiguiente, los datos sugieren una función potencial para la formación de imágenes de PET de [¹²⁴I]-PU-H71 de la farmacocinética del tumor en guiar el diseño de dosificación de PUH71, análogo al uso de la farmacocinética del plasma en guiar la dosificación hacia lograr las concentraciones en plasma de estado permanente.

30 Para explorar esto, los inventores estimaron las concentraciones tumorales de PU-H71 que resultarían en la administración de 5, 25, 50 y 75 mg/kg de PU-H71 en un programa de 3 administraciones a la semana (3xsemana; Lunes/Miércoles/Viernes) con fines de semana libres (**Figura 32a**). Las simulaciones se llevaron a cabo para determinar las concentraciones tumorales de PU-H71 cuando se administran en este programa y en las dosis indicadas (**Figura 32a**). La AUC tumoral, y las concentraciones tumorales promedio y mínimas de PU-H71 ([PU-H71]_{avg} y [PUH71]_{min}, respectivamente) que resultaron en este programa y en estas dosis también se determinaron (**Figura 32a, recuadro**). Las concentraciones de PU-H71 predichas en los tumores variaron de [PU-H71]_{min} = 0.17 a 2.54 μ M y [PU-H71]_{avg} = 0.49 a 7.45 μ M, para la dosis administrada de 5 a 75mg/kg, respectivamente (véase el recuadro en la **Figura 32a**).

40 Como se menciona, la exposición *in vitro* de células cancerosas de mama MDA-MB-468 a concentraciones de PU-H71 más bajas (0.05 a 1 μ M) da por resultado la inhibición del crecimiento celular potente con una IC₅₀ reportada de 60 a 100nM¹⁰⁰. En concentraciones de PU-H71 más altas (>2 μ M), y cuando estas células cancerosas se exponen al fármaco durante 48 horas, se notó el extermínio de células cancerosas masivo por la apoptosis (es decir >70% de células que se someten a la apoptosis) (**Figura 32b**). En vista de estos análisis *in vitro*, se predice que en el 45 programa de 3xsemana, la administración de las dosis de 5 a 75mg/kg de PU-H71 dará por resultado las concentraciones de fármaco tumorales terapéuticamente efectivas que abarcan valores que predicen principalmente los efectos inhibidores del tumor (a 5 mg/kg) a la apoptosis del tumor potente (75mg/kg) (**Figura 32b**). De hecho, cuando los ratones que llevan tumores xenoinjertados MDA-MB-468 se trataron con PU-H71 como se describe en lo anterior, una respuesta dependiente de la dosis se observó en los tumores tratados con PU-H71 (**Figura 32c**). Despues de un período de tratamiento de 7 semanas, se notó una respuesta tumoral significativa con 63, 82 y 99% 50 de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) observada en la dosis de 5, 25 y 50 mg/kg, respectivamente, y una regresión del 100% en la dosis de 75mg/kg (**Figura 32c**).

55 Los inventores continuaron el tratamiento hasta que los tumores en el brazo de control alcanzaron el tamaño máximo permitido por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IUCAC) (**Figura 32d**) y se sacrificaron los ratones un Jueves (24 horas después de la última dosis administrada el Miércoles). Solo los animales en el brazo de 5 mg/kg alojaron tumores suficientemente grandes para un análisis por Western blot y LC-MS/MS (volumen del tumor: $139 \pm 66 \text{ mm}^3$), aunque significativamente más pequeños que aquellos tratados con el vehículo solamente (volumen del tumor: $1126 \pm 396 \text{ mm}^3$) (**Figura 32d**).

60 La resolución de la ecuación (1a) para las dosis administradas de PU-H71 de 5 mg/kg y el uso de los datos del tiempo-actividad medidos para [¹²⁴I]-PU-H71 en el tumor (**Figura 30d**), produce las concentraciones tumorales de PU-H71 durante el período de tratamiento (**Figura 32e**). Las simulaciones de los inventores sugieren que la

concentración tumoral de PU-H71 en el momento del sacrificio debería ser de $0.43\mu\text{M}$ (**Figura 32e**), que es notablemente similar a la concentración actual de $0.52\pm0.13\mu\text{M}$ determinada en estos tumores por LC-MS/MS (**Figuras 32f, 32g**). Además, el efecto farmacodinámico observado, particularmente la inhibición de HSP90 como es mostrada por la degradación de Akt significativa (una disminución de 57%; $P=0.0017$; **Figura 32f y Figura 32g**), panel izquierdo) y la escisión PARP (**Figura 32f**) en los tumores fue consistente con la concentración de PU-H71 terapéuticamente efectiva en los tumores en este tiempo (**Figura 32g, panel derecho**). Estos descubrimientos muestran que la captación tumoral de PU-H71 permaneció sin cambio durante las 12 semanas de tratamiento, consistente con la respuesta persistente de estos tumores a PU-H71 (**Figura 32d y Referencia 100**), indicando que la PET de [^{124}I]-PUH71 se puede usar para supervisar la persistencia de respuesta o a la inversa, el potencial de la resistencia adquirida a la terapia de HSP90.

Uso de PET de [^{124}I]-PU-H71 para diseñar un régimen de programa eficaz para la terapia de HSP90

Considerando la retención prolongada de PU-H71 por los tumores, los inventores se preguntaron si la administración menos frecuente del agente mantendría su efectividad. En el contexto clínico, esto puede ser útil como una justificación para continuar con la terapia en una dosis más baja en pacientes que experimentan toxicidad o equilibrar razonablemente la dosificación y la frecuencia de dosis en el diseño de programas de dosificación.

Las simulaciones se llevaron a cabo para el PU-H71 administrado a 75 mg/kg en el programa de 3-(Lunes-Miércoles-Viernes), 2-(Lunes y Viernes) o 1-(Lunes) administraciones por semana (**Figura 33a**). Estos cálculos sugieren que los tumores se expondrán a un $[\text{PU-H71}_{\text{tumor}}]_{\text{prom}}$ de 7.45, 5.41 y $2.88\mu\text{M}$, en los programas de 3xsemana, 2xsemana y 1xsemana, respectivamente (**Figura 33a**), indicando que el programa de administración menos frecuente aún debe administrar las concentraciones terapéuticamente efectivas al tumor (**Figura 33b**). De hecho, se obtuvo la inhibición del crecimiento tumoral significativo en el programa de 1xsemana, mientras que la administración de 2xsemana condujo a las regresiones tumorales durante las 5 semanas de tratamiento (**Figura 33c**). En los tumores evaluables (es decir los brazos del tratamiento de control y 5 mg/kg), los cambios en los marcadores farmacodinámicos se analizaron cuando los ratones se sacrificaron 24 y 96 horas después de la última dosis administrada.

El agotamiento significativo y casi total de las oncoproteínas (95% de disminución de nivel, $P=0.0021$ y $P=0.0025$ a las 24h y 96h, respectivamente) se observó en ambos puntos de tiempo (**Figura 33d**), sugiriendo que las concentraciones de PU-H71 de saturación objetivo ($>2\mu\text{M}$) deben estar presentes en los tumores en esos puntos de tiempo. En esos tumores, la concentración tumoral predicha de PET de PU-H71 es 5.51 y $2.18\mu\text{M}$ a 24h y 96h, respectivamente (**Figura 33a, panel 1xsemana**), que concuerda estrechamente con las concentraciones tumorales actuales de 5.53 ± 0.26 y 3.09 ± 1.40 , respectivamente, medidas por LC-MS/MS (**Figura 33e**).

La metodología descrita en lo anterior es fácilmente aplicable a pacientes humanos. Un ejemplo se representa en la **Figura 34** y **Figura 35**. La **Figura 34** muestra la PET/CT de [^{124}I]-PU-H71 de un paciente con cáncer pancreático recurrente con enfermedad metastásica a los pulmones y a los ganglios linfáticos adyacentes. Las imágenes de PET en varios tiempos posteriores a la inyección de [^{124}I]-PU-H71 (4, 24, 48 y 192h) se cuantificaron y los datos SUV obtenidos para [^{124}I]-PU-H71 se convirtieron a concentraciones para una dosis administrada de PU-H71 de $20\text{mg}/\text{m}^2$. Estos tumores muestran una captación muy buena de [^{124}I]-PU-H71 con retención y visualización aún 192h (8 días después de la administración). La PET/CT de [^{124}I]-PU-H71 predice que este paciente es probable que responda a la terapia de HSP90. La retención de PU-H71 en el tumor por tiempos más allá de 192h (8 días) no se predijo por los experimentos de ratón, donde como se observa en la **Figura 30**, el [^{124}I]-PU-H71 se eliminó de los tumores MDA-MB-468 en las 150h posteriores a la administración. El cálculo de las concentraciones de PU-H71 en varios puntos de tiempo de 0 a 192h también permite el cálculo de un área bajo la curva (AUC) de tumor. En la **Figura 34**, el área bajo la curva para los diversos nódulos de pulmón y ganglios linfáticos (LN) se calcula de 0 a 192 horas.

La exposición de estos tumores a PU-H71 como se determina por PU-PET permite la determinación de una dosis óptima y programa para tratar a este paciente. Específicamente, la exposición a PU-H71 de dos tumores característicos, uno en el pulmón izquierdo y otro en el LN del hilio derecho a través del tiempo del régimen de tratamiento de dos semanas cuando se administra una dosis de $20\text{mg}/\text{m}^2$ en un programa de dos semanas (Martes y Viernes) se calcularon y se representan como el área bajo la curva (AUC) y como una concentración tumoral promedio (**Figura 35, panel superior**). Los tumores muestran buena exposición al fármaco con valores de AUCs de 190 y $499\mu\text{M}\cdot\text{h}$, respectivamente y concentraciones tumorales promedio del inhibidor de HSP90 de 0.71 y $1.57\mu\text{M}$, respectivamente. En los modelos preclínicos del cáncer pancreático tales concentraciones son efectivas en inhibir el crecimiento, reducir su potencial invasivo y metastásico e inducir la apoptosis en las células cancerosas pancreáticas, sugiriendo que la dosis de $20\text{mg}/\text{m}^2$ administrada en un programa de 2xsemana (Martes-Viernes) es probable que beneficie al paciente.

Como también se muestra en la **Figura 35** (paneles inferiores, se llevaron a cabo simulaciones similares en una dosis de 40 mg/m² y 80mg/m² en un programa de dos veces por semana (Martes y Viernes). Lo más óptimo en cuanto a la predicción del PU-PET es una dosis de $80\text{mg}/\text{m}^2$ administrada en un programa de 2xsemana (Martes y Viernes), donde la exposición del tumor y la concentración tumoral promedio durante los 0-336 días alcanzaría arriba de 760 y $1998\mu\text{M}\cdot\text{h}$ y 2.8 y $6.3\mu\text{M}$ (**Figura 35, panel de fondo**), respectivamente. Estos valores se predicen por los estudios preclínicos (**Figuras 32 y 33**) para dar por resultado las regresiones y curas significativas.

La Figura 36 muestra cálculos similares para un paciente con cáncer de mama HER2+ con enfermedad con metástasis al pulmón. Los paneles superiores muestran los resultados del ensayo de PET con [¹²⁴I]-PU-H71. Los paneles intermedios e inferiores muestran concentraciones tumorales de PU-H71 en varios tiempos basados en una dosificación de PU-H71 administrada de 10 mg/m². Los datos farmacocinéticos se reportan en términos de la AUC del PU-H71 en el tumor entre 0 o 336 horas o la concentración promedio del fármaco en el tumor durante ese período de tiempo. Los datos de PU-PET predicen que cuando se administra dos veces a la semana durante dos semanas, una dosis de 10mg/m² administraría una AUC_{0-336h} de tumor de 103µM·h y mantendrían una concentración tumoral promedio de 0.59µM y de esta manera en este programa, una dosis de 80-100mg/m² y más allá se requeriría para una respuesta favorable. Cuando se administra tres veces a la semana durante dos semanas, una dosis de 10mg/m² daría una AUC_{0-336h} de tumor de 140.8µM·h y mantendría una concentración tumoral promedio de 0.71µM y de esta manera en este programa, una dosis de 60mg/m² y más allá se requeriría para una respuesta favorable. Cuando se administra una vez a la semana durante dos semanas, una dosis de 10mg/m² daría una AUC_{0-336h} de tumor de solamente 54µM·h y mantendría una concentración tumoral promedio de 0.41µM y de esta manera en este programa, una dosis de 200mg/m² y más allá se requeriría para una respuesta favorable. Cuando se administra 5 veces a la semana (diariamente con el fin de semana libre) durante dos semanas, una dosis de 10mg/m² daría una AUC_{0-336h} de tumor de 189.8µM·h y mantendría una concentración tumoral promedio de 0.81µM y de esta manera en este programa, una dosis de 50mg/m² y más allá se requeriría para una respuesta favorable.

Colectivamente, estos datos demuestran la utilidad de la PET de [¹²⁴I]-PU-H71 para informar en el diseño de una dosis eficaz y régimen de programa de dosificación para el uso clínico personalizado de las terapias de HSP90.

Exposición del tumor a PU-H71, como es determinado por la PET de [¹²⁴I]-PU-H71, predice confiablemente la respuesta antitumoral a la terapia de HSP90

El entendimiento del número de sitios objetivo que requieren la inhibición a través del tiempo del tratamiento para dar por resultado la cura sigue siendo un problema principal en la terapia dirigida. Por lo tanto los inventores simularon, para los diversos regímenes de dosis y programas investigados en lo anterior, la ocupación de los sitios de HSP90 por el inhibidor durante el período de tratamiento (Figura 37a). Entonces los inventores intentaron realizar un análisis correlativo de la ocupación de HSP90 tumoral con la respuesta antitumoral observada (Figura 37b).

El número de sitios de HSP90 tumoral ocupados por el PU-H71 por gramo de tumor (sitios de HSP90/g) cuando el PU-H71 se administra en las dosis terapéuticas (5 a 75mg/kg o 5000 a 75.000ng/g en ratones) se puede obtener usando la Ecuación (4). Debido a que un gramo del tumor MDA-MB-468 contiene un máximo de 160.7x10⁻³ nmoles de HSP90 (Figura 31d, BMAX) y dado que la ocupación de más de 100% de los sitios no es posible, los inventores podrían simular la ocupación de los sitios de HSP90 durante el tiempo de tratamiento para cada régimen de dosis y programa (Figura 37a).

La ocupación objetivo, medida como el % de sitios de HSP90 promedio ocupados y reconocidos por el PU-H71 ((% de sitios de HSP90 ocupados)_{prom}) durante el tiempo de tratamiento (Figura 37b), como la concentración tumoral promedio de PU-H71 registrada durante el tiempo de tratamiento ([PU-H71]_{tumor prom}; Figura 37c) y como la exposición del tumor durante el tiempo de tratamiento como es calculado por la AUC de tumor se correlacionó significativamente bien con la magnitud del efecto antitumoral observado ($r^2=0.7559, 0.8162$ y 0.8188 , respectivamente). Los análisis de los inventores sugieren la ocupación de más de 80% de los sitios de HSP90 tumoral promediados durante el tiempo de tratamiento (Figura 37b), o el mantenimiento de una concentración tumoral promedio de 5µM del inhibidor de HSP90 (Figura 37c), es necesario para la regresión y cura del tumor MDA-MB-468. La menor ocupación sin embargo, como es obtenida por un promedio de 15% y superior de los sitios ocupados o logrados por el mantenimiento de una concentración tumoral promedio durante el tiempo de tratamiento de 0.5µM y superior, aún puede realizar a una respuesta parcial (Figuras 37b, 37c).

45 *Planteamiento*

Basado en el análisis anterior, los inventores han diseñado y desarrollado el primer ensayo basado en PET no invasivo con uso potencial en el desarrollo clínico de los inhibidores de HSP90. Los inventores muestran su uso en la determinación de la farmacocinética y farmacodinámica intratumoral del fármaco precursor, en la determinación de la dosis del inhibidor de HSP90 necesario para lograr las concentraciones tumorales efectivas, en someter a ensayo la concentración actual del fármaco administrado al tumor y en diseñar un régimen de dosis y programa eficaz basado en la eficiencia de modulación objetivo y dosis tolerada no máxima (MTD). También los inventores muestran su uso en la selección de pacientes que pueden tener más probablemente una respuesta tumoral a la HSP90 objetivo.

Otros han mostrado en estudios preclínicos o clínicos que los fármacos etiquetados con carbono 11, flúor 18 y nitrógeno 13, tal como N-[¹¹C]-metil-imatinib¹²², 3-N-metil y 4-carbonil-[¹¹C]-temozolomida¹²³, N-[2-(dimetilamino)ethyl]acridina-4-carboxamida ([¹¹C]DACA)¹²⁴, [¹⁸F]5-FU¹²⁴, derivado de [¹⁸F]flúor de dasatinib¹²⁵ y [¹³N]cisplatina¹²⁶ fueron útiles para estimar los parámetros farmacocinéticos de PET para agentes cuyas vidas medias son significativamente menores que el tiempo de muestreo total durante el escaneo. Para los inhibidores de HSP90, cuyas vidas medias tumorales (es decir >24h) son más prolongadas que la duración del muestreo permitido por estos isótopos (es decir 10min, 20min y 110min para ¹¹C, ¹³N y ¹⁸F, respectivamente), las evaluaciones

farmacocinéticas de la PET usando estos radioisótopos son inapropiados. Debido a la vida media relativamente prolongada de ^{124}I , el ensayo de PET de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ es de esta manera el primer ensayo reportado que es capaz de supervisar no invasivamente y cuantitativamente la farmacocinética del tumor de los inhibidores de HSP90 (**Figura 38**).

5 Además, el ensayo de PET de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ es una verdadera materialización del concepto de la formación de imágenes dirigida para la terapia dirigida usando cantidades residuales biológicamente inactivas radioetiquetadas de los agentes terapéuticos dirigidos para la formación de imágenes médicas¹²⁷⁻¹³¹. Mientras que el concepto es bien reconocido y sumamente recomendado para el futuro del desarrollo de fármacos, proporcionando una vía hacia la medicina personalizada, no existe precedente para el uso de un agente terapéutico de molécula pequeña de oncología como un agente de formación de imágenes para seleccionar los pacientes más sensibles a su acción farmacológica ni asesoramiento sobre el programa de su dosis administrada. Debido a la presencia de yodo en la estructura nativa del PU-H71 y por lo tanto la ausencia de cualquier perturbación de su estructura y comportamiento biológico por la incorporación de una etiqueta de radioyodo, el ensayo de PET de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ es para el conocimiento de los inventores uno de los primeros ensayos de su clase. Específicamente, el perfil de biodistribución observado de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$, particularmente la retención del tumor con eliminación rápida del tejido no tumoral, refleja aquella del agente terapéutico PU-H71. Además, mientras que la formación de los metabolitos de fármaco limita la aplicación de los fármacos etiquetados para PET⁴¹, los datos de los inventores muestran que el ensayo de PET de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ mide con precisión las concentraciones de PU-H71 tumoral en niveles de tanto microdosis como de dosis terapéutica, indicando que los metabolitos de PU-H71 no contribuyen significativamente a las actividades tumorales medidas por PET. En conjunto, estos descubrimientos sugieren que el $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ es adecuado para el uso como un “trazador” *in vivo* real de PU-H71.

En el desarrollo de la terapia de cáncer dirigida es bien entendido que los ensayos clínicos requieren conocimiento sobre si las concentraciones tumorales efectivas se logran y si el objetivo se modula apropiadamente. Los datos de los inventores muestran que el ensayo de PET de $[^{124}\text{I}]\text{-PUH71}$ mide cuantitativamente la farmacocinética inhibidora de la HSP90 tumoral permitiendo las correlaciones de dosis tumoral-respuesta tumoral que son más informativas que las correlaciones de respuesta tumorales convencionales con dosis inyectada o farmacocinética del plasma. Los datos de los inventores también muestran que para el PU-H71, la farmacocinética del tumor refleja la farmacodinámica del tumor, identificando la PET de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ como una medición no invasiva de ambos parámetros. De esta manera, la farmacocinética del tumor, también indicativa de la ocupación objetivo, tiene potencia predictiva en el entendimiento de la respuesta tanto inmediata (es decir modulación objetivo después de una dosis de inhibidor) como a largo plazo (es decir, modulación objetivo durante el programa diseñado) a un régimen de tratamiento de inhibidor de HSP90. Además, al evaluar la farmacocinética del tumor de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ en pacientes individuales que se consideran para la terapia de HSP90, también se pueden identificar pacientes que se benefician más probablemente del tratamiento con HSP90 y en consecuencia ajustan la dosis terapéutica y el programa, basados en la captación del tumor y la eliminación de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ (**Figura 38a**).

También los inventores muestran que el ensayo puede guiar el desarrollo de regímenes de dosificación individualizados basados en la farmacocinética de la HSP90 tumoral derivada de PET, como un biomarcador de formación de imágenes del grado de la HSP90 tumoral objetivo y su saturación por una dosis terapéutica de inhibidor de HSP90, con potencial para predecir el efecto antitumoral y el resultado a través del curso de la terapia de HSP90 (**Figura 38b**). Debido a estas características, el ensayo de PET de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ es óptimo para el uso en estudios clínicos del inhibidor de HSP90 como una herramienta farmacométrica para entender (**Figura 38a**) y, potencialmente, predecir la respuesta tumoral al tratamiento de HSP90 (**Figura 38b**).

Los datos de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ también proporcionan una estrategia de dosificación más racional y efectiva en la terapia dirigida a HSP90 basada en la concentración tumoral máximamente efectiva derivada de PET antes que la dosis tolerada máxima convencional (MTD). Este procedimiento se dirige hacia una nueva meta de dosificación para lograr una dosis tumoral máxima, un nivel de dosis óptimo en el cual los objetivos tumorales se saturan casi por el fármaco, como es visualizado por la PET (**Figura 38c**). Este procedimiento evitaría la escalada de dosis adicional que solo puede incrementar la toxicidad del paciente no la eficacia antitumoral. Si la saturación tumoral se observa en una dosis terapéutica menor que una dosis tolerada máxima (MTD) (como es determinado por un ensayo de escalada de dosis, por ejemplo), entonces una estrategia de dosificación podría perseguir el descubrimiento de la frecuencia tolerada máxima de dosificación de la concentración tumoral máximamente efectiva de saturación como es determinada por la PET. La PET de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ podría explorar la duración de la saturación tumoral después de una dosis tumoral máximamente efectiva para informar adicionalmente la selección de la frecuencia de dosificación. La PET de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ se podría usar similarmente para guiar la selección de dosis y frecuencia de otros inhibidores de HSP90. La capacidad de una dosis terapéutica de un agente dirigido a HSP90 para inhibir competitivamente la orientación del tumor por el trazador $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ podría proporcionar un índice de saturación de fármaco tumoral. Para el desarrollo clínico de los inhibidores de HSP90, la PET de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ se podría usar para acumular datos farmacocinéticos tumorales de una población de ensayo de fase 1/2 para derivar una estrategia de dosificación generalmente aplicable o se podría usar sobre una base de paciente individual para una selección de programas de dosis verdaderamente “personalizados”. La formación de imágenes de PU-H71 mediante PET, los inventores creen, que es una herramienta clínica bien adecuada para someter a prueba esta hipótesis. Con un ensayo de microdosis de Fase 0 de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ actualmente en curso, y el ensayo de PET de $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ que se incorpora en un estudio clínico de Fase 1 próximo de PU-H71 en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, este

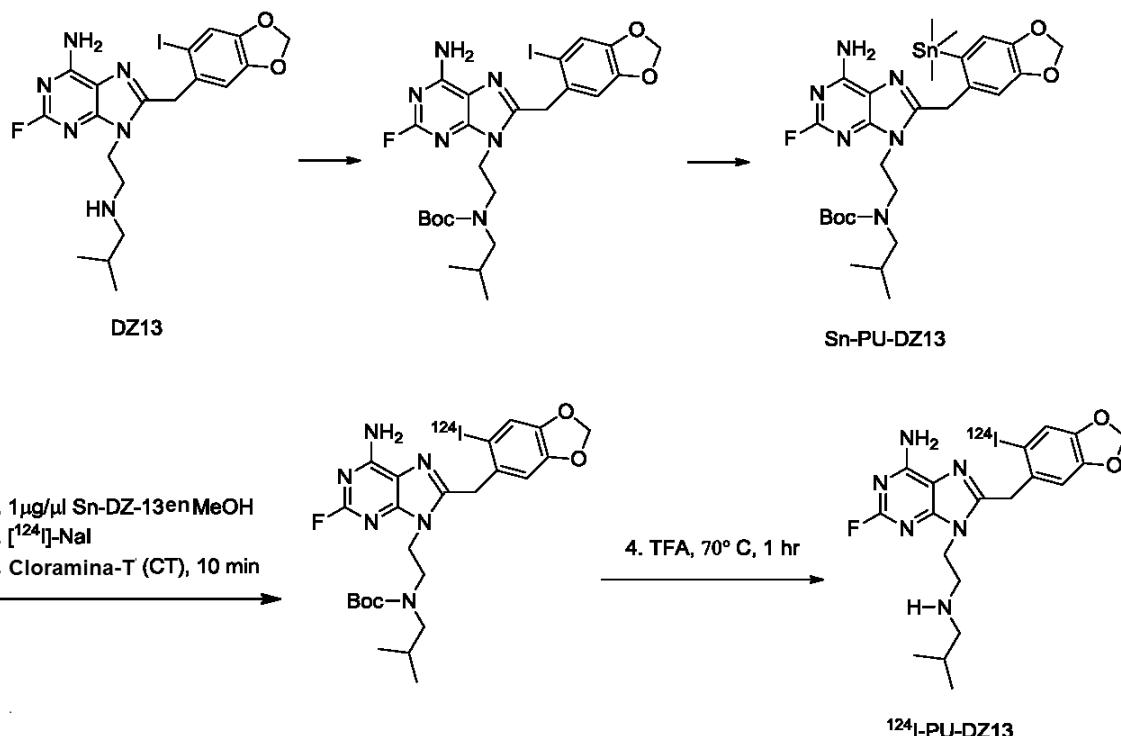
concepto se evaluará pronto en un contexto clínico.

En conclusión, la PET de [¹²⁴I]-PU-H71, como un ensayo dirigido de la HSP90 tumoral, puede avanzar notable y razonablemente la selección de pacientes, selección de dosis, diagnóstico tumoral y evaluación de la respuesta tumoral en el nivel del objetivo molecular en la terapia dirigida a HSP90. Como tal, el ensayo de PET de [¹²⁴I]-PU-

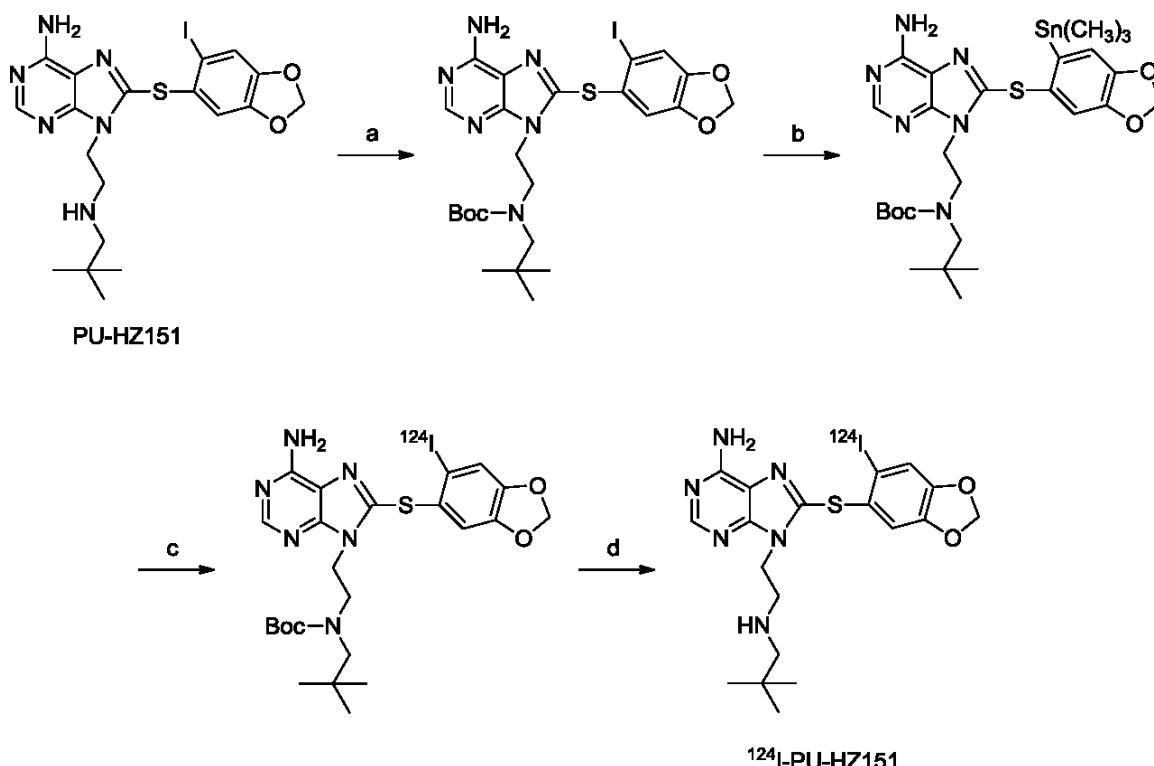
5 H71 novedoso debe facilitar el desarrollo clínico óptimo con una buena relación costo-eficacia y racional y el uso de los inhibidores de HSP90 en el cáncer. El uso de la PET de [¹²⁴I]-PU-H71 representa un avance importante en el diseño de ensayos clínicos de inhibidores de HSP90 y promueve el paradigma de la farmacométrica de formación de imágenes dirigida para el desarrollo de otros agentes terapéuticos dirigidos.

5.2.2.2. [¹²⁴I]-PU-DZ13 y [¹²⁴I]-PU-HZ151

10 Otros inhibidores de HSP90 con yodo endógeno se evaluaron por su capacidad de desarrollarse en el ensayo de PET de HSP90. Dos compuestos de este tipo que incluyen [¹²⁴I]-PU-DZ13 y [¹²⁴I]-PU-HZ151, se sintetizaron, como se muestra en los **Esquemas 16 y 17**.



Esquema 16: Síntesis de [¹²⁴I]-PU-DZ13



ESQUEMA 17: Síntesis de [¹²⁴I]-PU-HZ151. Reactivos y condiciones: a. Et₃N, (Boc)₂O, CH₂Cl₂, rt; b. Pd(PPh₃)₄, hexametilditina, dioxano, 90°C; c. [¹²⁴I]-NaI, cloramina-T, rt, 10 min.; d. TFA, 70°C, 60 min.

Los rendimientos radioquímicos de estos compuestos fueron 36.96 ± 12.97% ([¹²⁴I]-PU-DZ13), 36.45 ± 15.75% ([¹²⁴I]-PU-HZ151) y 45.33 ± 15.76% ([¹²⁴I]-PU-H71); la pureza radioquímica (>98%) se confirmó por HPLC. Las actividades específicas fueron 633 mCi/μmol ([¹²⁴I]-DZ13), 576 mCi/μmol ([¹²⁴I]-HZ151) y 1000 mCi/μmol ([¹²⁴I]-PU-H71).

A fin de evaluar la estabilidad *in vitro* de [¹²⁴I]-PU-H71 y [¹²⁴I]-PU-DZ13, los compuestos se incubaron en sueros humanos a 37°C durante cinco días, y se analizaron por ITLC para determinar si se presentó la desalogenación. Se determinó que tanto [¹²⁴I]-PU-H71 como [¹²⁴I]-PU-DZ13 fueron estables (> 98%) durante cinco días (120 h).

El tumor retiene [¹³¹I]-PU-DZ13 cuando se administra por las vías tanto IV como IP, sin embargo, la retención del tumor es más alta por la administración IV, con significancia estadística ($P < 0.05$) (24 h posterior a la administración, vías intravenosas contra intraperitoneal). En los ratones que no llevan tumor C57BL/6J, el [¹³¹I]-PU-DZ13 se elimina rápidamente de la sangre cardíaca (% de ID/g fue 3.33 ± 0.13 en 2 min y 0.013 ± 0.00 24 h después de la administración), y tiene la captación más grande por el estómago y los intestinos (3-8% ID/g). Las captaciones del hígado y bazo no fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$), sugiriendo la implicación del sistema reticuloendotelial (RES). La captación del riñón de [¹³¹I]-PU-DZ13, sin embargo, implicó la inhibición urinaria (% de ID/g descendida de 5.53 ± 0.34 a 2 min (datos no mostrados) a 0.06 ± 0.01 24 h después de la administración). En el modelo de ratón TNBC con MDA-MB-468, [¹³¹I]-PU-DZ13 se retuvo por el tumor por más tiempo cuando se administró por la vía intravenosa comparada con la vía intraperitoneal. Por la administración IV, la captación de tumor de [¹³¹I]-PU-DZ13 (1.47 ± 0.22 %ID/g a 1 h), disminuyó lentamente (% de ID/g = 0.56 ± 0.14 , 4 h; 0.40 ± 0.03 , 12 h; 0.09 ± 0.03 , 24 h) durante 72 h (0.05 ± 0.00 % de ID/g). Como con los ratones que no llevan tumor, las captaciones gastrointestinales y RES de [¹³¹I]-PU-DZ13, y la eliminación renal se observó en MBA-MD-468. La biodistribución *in vivo* de [¹³¹I]-PU-DZ13, cuando se coadministró con PU-DZ13 a 25 mg/kg (24 h posteriores a la administración, vías intraperitoneales contra intravenosas), muestra que el PU-PET predijo que las concentraciones tumorales se comparan favorablemente con los valores determinados por LCMS-MS.

La formación de imágenes de PET *in vivo* detectaron los tumores MDA-MB-468 con los inhibidores de HSP90 [¹²⁴I]-PU-H71 y [¹²⁴I]-PU-DZ13. La **Figura 39** muestra los resultados de la formación de imágenes de PET 48 h después de la inyección, de los ratones inyectados sistémicamente con cualquier inhibidor ([¹²⁴I]-PU-H71 o [¹²⁴I]-PU-DZ13). Ambos inhibidores de HSP90 radioyodados detectaron los tumores con PET en cada punto de tiempo. La captación de % de ID/g de los dos inhibidores no fue significativamente diferente en las masas tumorales, aunque [¹²⁴I]-PU-DZ13 pareció cuantitativamente que tiene menos captación abdominal no específica.

A diferencia de [¹²⁴I]-PU-DZ13 y [¹²⁴I]-PU-H71, el [¹²⁴I]-PU-HZ151 no pudo detectar los tumores en los ratones

posiblemente debido a su rápido metabolismo por el hígado.

5.3. Tratamiento de pacientes con cáncer con PU-H71

Los métodos descritos en la sección 5.2.1. indican que los inhibidores de HSP90 radioetiquetados tal como [¹²⁴I]-PU-H71 se puede usar para identificar pacientes que es probable que respondan a la terapia de inhibición de HSP90 y para diseñar regímenes de dosificación optimizados para pacientes individuales. Los regímenes de dosificación se basan en tales factores como exposición del tumor del inhibidor y la ocupación de la HSP90 por el inhibidor. Estos parámetros farmacocinéticos se evalúan fácilmente usando los inhibidores radioetiquetados de la presente descripción. Debido al hecho de que los datos farmacocinéticos se pueden obtener fácilmente de un grupo grande de pacientes con cáncer individuales, los inventores tienen la capacidad de determinar un intervalo de parámetros farmacocinéticos que serán adecuados para lograr un nivel deseado de eficacia de un inhibidor de HSP90 particular sin problemas toxicológicos concomitantes provocados por la sobredosis con el inhibidor de HSP90.

Por consiguiente, la descripción proporciona adicionalmente métodos para tratar pacientes con tumores sólidos, malignidades hematológicas, y linfomas con inhibidores de HSP90, particularmente PU-H71, para lograr un perfil farmacocinético particular. La descripción también proporciona métodos para tratar tumores sólidos, malignidades hematológicas, y linfomas con inhibidores de HSP90, particularmente PU-H71, al administrar el inhibidor en niveles de dosificación particulares y/o programas de dosificación particulares. En modalidades particulares, el tumor que se trata con el inhibidor de HSP90 es un "tumor dependiente de HSP90". Como se plantea en lo anterior, un tumor dependiente de HSP90 es un tumor cuya fisiología usa la HSP90. Un tumor dependiente de HSP90 contiene una cantidad significativa de "HSP90 oncogénica" en relación con la HSP90 de mantenimiento normal. La metodología descrita en esta sección se puede aplicar a numerosos tipos de cánceres incluyendo pero no limitado a cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, carcinoma de células basales, melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas y adenocarcinoma, cáncer de mama de todos los subtipos, neuroblastoma, cánceres gastrointestinales incluyendo tumores estromales gastrointestinales, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer anal, tumores cerebrales incluyendo gliomas, linformas incluyendo linfoma folicular y linfoma de células B grandes difuso, mieloma múltiple, incluyendo otros trastornos de células plasmáticas, leucemias, neoplasias mieloproliferativas y cánceres ginecológicos incluyendo cánceres de ovario, cervical y de endometrio.

En una modalidad, la descripción proporciona métodos para tratar un paciente humano que tiene un tumor sólido, linfoma o malignidad hematológica que comprende administrar una cantidad suficiente de PU-H71 al paciente para proporcionar una ocupación de 15% o mayor de la HSP90 oncogénica en el tumor del paciente, una ocupación de 30% o mayor de la HSP90 oncogénica en el tumor del paciente, una ocupación de 50% o mayor de la HSP90 oncogénica en el tumor del paciente, o una ocupación de 60% o mayor de la HSP90 oncogénica en el tumor del paciente en por lo menos un punto en el tiempo entre aproximadamente 16 horas a aproximadamente 24 horas después de la administración del fármaco. Por ejemplo, la administración de PU-H71 puede proporcionar una ocupación de por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o 100% de la HSP90 oncogénica en el paciente en por lo menos un punto en el tiempo entre 16 y 24 horas después de la administración del fármaco. En una modalidad particular, la administración de PU-H71 puede proporcionar una ocupación de por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o 100% de la HSP90 oncogénica en el paciente aproximadamente 24 horas después de la administración del fármaco. En otra modalidad, la administración de PU-H71 puede proporcionar una ocupación de por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o 100% de la HSP90 oncogénica en el paciente en el intervalo completo entre 16 horas y 24 horas después de la administración del fármaco. El PU-H71 se puede administrar para proporcionar una ocupación de la HSP90 oncogénica ligada por cualquiera de los dos valores anteriores en por lo menos un punto en el tiempo en el intervalo completo entre aproximadamente 16 horas a aproximadamente 24 horas después de la administración del fármaco, *por ejemplo*, una ocupación de aproximadamente 20% a aproximadamente 80%, una ocupación de aproximadamente 30% a aproximadamente 80%, una ocupación de entre 40% y 80%, una ocupación de entre 40% y 90%, una ocupación de aproximadamente 50% a aproximadamente 80%, una ocupación de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, una ocupación de aproximadamente 60% a aproximadamente 80%, una ocupación de aproximadamente 60% a aproximadamente 99%, una ocupación de aproximadamente 50% a aproximadamente 99%, una ocupación de aproximadamente 50% a aproximadamente 99.9%, una ocupación de aproximadamente 70% a aproximadamente 99.9%, *etc.* En otra modalidad, el PU-H71 se administra en la dosificación mínima para lograr 100% de ocupación de la HSP90 oncogénica. Como se plantea en la Sección 5.2.1.1., la administración de PU-H71 para proporcionar las ocupaciones de la HSP90 oncogénica anteriores da por resultado dosis eficaces de PU-H71. En una modalidad particular, el paciente con el tumor es un paciente humano con un tumor dependiente de HSP90.

En otra modalidad, la descripción proporciona métodos para tratar un paciente que tiene un tumor sólido, linfoma o malignidad hematológica que comprende administrar una cantidad suficiente de PU-H71 al paciente para una concentración tumoral a 24 horas después de la administración en el intervalo de aproximadamente 0.3 µM a

- aproximadamente 7.5 μM . Por ejemplo, la concentración de PU-H71 en el tumor aproximadamente 24 horas después de la administración de PU-H71 puede ser de 0.3 μM , 1 μM , 3 μM , 5 μM o 7 μM . El PU-H71 se puede administrar para proporcionar una concentración tumoral del fármaco después de aproximadamente 24 horas entre cualquiera de los dos valores anteriores, *por ejemplo*, una concentración tumoral de aproximadamente 1 μM a 5
- aproximadamente 3 μM , una concentración tumoral de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 5 μM , una concentración tumoral de aproximadamente 3 μM a aproximadamente 5 μM , una concentración tumoral de aproximadamente 3 μM a aproximadamente 7 μM , etc. En una modalidad particular, el paciente con el tumor es un paciente humano con un tumor dependiente de HSP90.
- 10 En otra modalidad, la descripción proporciona métodos para tratar a un paciente que tiene un tumor sólido, linfoma o malignidad hematológica que comprende administrar una cantidad suficiente de PU-H71 al paciente para proporcionar una concentración tumoral aproximadamente 48 horas después de la administración en el intervalo de aproximadamente 0.05 μM a aproximadamente 3.5 μM . Por ejemplo, la concentración de PU-H71 en el tumor aproximadamente 48 horas después de la administración de PU-H71 puede ser de aproximadamente 0.5 μM , 15
- aproximadamente 1 μM , aproximadamente 1.5 μM , aproximadamente 2 μM o aproximadamente 3 μM . El PU-H71 se puede administrar para proporcionar una concentración tumoral del fármaco después de aproximadamente 48 horas entre cualquiera de los dos valores anteriores, *por ejemplo*, una concentración tumoral de aproximadamente 1 μM a 20
- aproximadamente 2 μM , una concentración tumoral de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 3 μM , una concentración tumoral de aproximadamente 0.5 μM a aproximadamente 2 μM , una concentración tumoral de aproximadamente 0.25 μM a aproximadamente 2 μM , etc. En una modalidad particular, el paciente con el tumor es un paciente humano con un tumor dependiente de HSP90.
- En otra modalidad, la descripción proporciona métodos para tratar a un paciente que tiene un tumor sólido, linfoma o malignidad hematológica que comprende administrar una cantidad suficiente de PU-H71 al paciente para proporcionar una concentración tumoral aproximadamente 24 horas después de la administración en el intervalo de 25
- aproximadamente 0.3 μM a aproximadamente 7.5 μM y aproximadamente 48 horas después de la administración en el intervalo de aproximadamente 0.05 μM a aproximadamente 3.5 μM . En una modalidad particular, el paciente con el tumor es un paciente humano con un tumor dependiente de HSP90.
- Como se plantea en la Sección 5.2.1.1., el ensayo radioetiquetado proporciona un medio conveniente para determinar la exposición del tumor de PU-H71. La exposición del tumor se puede medir usando varios parámetros farmacocinéticos tal como AUC en el tumor y la concentración tumoral promedio del fármaco durante un período de 30
- tiempo particular. Basado en la riqueza de los datos farmacocinéticos acumulados sobre los pacientes con numerosos tumores sólidos, los inventores han determinado que la medición de la AUC y la concentración tumoral promedio durante un período de tratamiento particular (*por ejemplo*, dos semanas) proporciona información importante con respecto a la eficacia y toxicología del fármaco. Como se plantea en lo anterior, el término "AUC de tumor" se refiere a la concentración intracelular acumulativa del fármaco durante el período de tiempo desde la 35
- administración del fármaco hasta otro punto en el tiempo. Por ejemplo, la AUC en el espacio de agua del tumor a través de un período de tiempo de 0 horas a 336 horas es referida en la presente como $\text{AUC}_{0-336\text{h}}$ de tumor. El punto de tiempo "0" puede referirse al tiempo cuando el fármaco primero se administra en el inicio de un nuevo ciclo de tratamiento. Como alternativa, el punto de tiempo "0" puede referirse al punto de tiempo en que el fármaco se administra en la mitad de un ciclo de tratamiento. Se entenderá que múltiples dosis del fármaco se pueden 40
- administrar en varios tiempos entre el punto de tiempo 0 y el punto de tiempo de 336 horas. Como se plantea a continuación, los valores de AUC de tumor y las concentraciones tumorales promedio que se encuentran dentro de los intervalos particulares proporcionan dosis eficaces.
- En una modalidad, la descripción proporciona métodos para tratar un paciente que tiene un tumor sólido, linfoma o 45
- malignidad hematológica que comprende administrar una cantidad suficiente de PU-H71 al paciente que proporciona una $\text{AUC}_{0-336\text{h}}$ de aproximadamente 150 a aproximadamente 4000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$. Por ejemplo la $\text{AUC}_{0-336\text{h}}$ de tumor de PU-H71 puede ser de aproximadamente 300 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 500 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 800 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, 50
- aproximadamente 1200 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 1500 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 2000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 3000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ o aproximadamente 4000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$. El PU-H71 se puede administrar para proporcionar una $\text{AUC}_{0-336\text{h}}$ de tumor entre cualquiera de los dos valores anteriores, *por ejemplo*, una $\text{AUC}_{0-336\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 300 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a 55
- aproximadamente 800 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-336\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 500 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 800 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-336\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 500 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 1000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-336\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 1000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 1500 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-336\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 1000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a 60
- aproximadamente 2000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-336\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 1500 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 2000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-336\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 2000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 3000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-336\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 3000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 4000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, etc. En una modalidad, el punto de tiempo "0" es el inicio de un nuevo ciclo de tratamiento. En una modalidad particular, el paciente con el tumor es un paciente humano con un tumor dependiente de HSP90.
- 60 En otra modalidad, la descripción proporciona métodos para tratar un paciente que tiene un tumor sólido, linfoma o malignidad hematológica que comprende administrar una cantidad suficiente de PU-H71 al paciente que proporciona una $\text{AUC}_{0-168\text{h}}$ de aproximadamente 75 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 2000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$. Por ejemplo la $\text{AUC}_{0-168\text{h}}$ de tumor de

- PU-H71 puede ser de aproximadamente 75 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 250 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 400 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 600 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 750 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 1000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 1500 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ o aproximadamente 2000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$. El PU-H71 se puede administrar para proporcionar una $\text{AUC}_{0-168\text{h}}$ de tumor entre cualquiera de los dos valores anteriores, por ejemplo, una $\text{AUC}_{0-168\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 150 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 400 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-168\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 200 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 500 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-168\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 500 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 750 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-168\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 750 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 1000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-168\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 1000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 1500 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-168\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 1500 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 2000 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, etc. En una modalidad, el punto de tiempo "0" es el inicio de un nuevo ciclo de tratamiento. En una modalidad particular, el paciente con el tumor es un paciente humano con un tumor dependiente de HSP90.
- En otra modalidad, la descripción proporciona métodos para tratar un paciente que tiene un tumor sólido, linfoma o malignidad hematológica que comprende administrar una cantidad suficiente de PU-H71 al paciente que proporciona una $\text{AUC}_{0-48\text{h}}$ de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$. Por ejemplo la $\text{AUC}_{0-48\text{h}}$ de tumor de PU-H71 puede ser de aproximadamente 15 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 20 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 25 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ aproximadamente 30 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 40 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 50 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 80 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 100 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, aproximadamente 150 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ o aproximadamente 200 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$. El PU-H71 se puede administrar para proporcionar una $\text{AUC}_{0-48\text{h}}$ entre cualquiera de los valores anteriores, por ejemplo, una $\text{AUC}_{0-48\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 10 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 100 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-48\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 10 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 80 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-48\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 15 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 80 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-48\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 15 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 50 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-48\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 20 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 50 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, una $\text{AUC}_{0-48\text{h}}$ de tumor que varía de aproximadamente 20 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ a aproximadamente 30 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, etc. En una modalidad, el punto de tiempo "0" es el inicio de un nuevo ciclo de tratamiento. En una modalidad particular, el paciente con el tumor es un paciente humano con un tumor dependiente de HSP90.
- En otra modalidad, la descripción proporciona métodos para tratar un paciente que tiene un tumor sólido, linfoma o malignidad hematológica que comprende administrar una cantidad suficiente de PU-H71 al paciente que proporciona una concentración tumoral promedio de PU-H71 (referido en la presente como $[\text{PU-H71}]_{\text{prom}}$) entre 0 y 336 horas de aproximadamente 0.5 μM a aproximadamente 7.5 μM . Por ejemplo, el $[\text{PU-H71}]_{\text{prom}}$ entre 0 y 336 horas puede ser de aproximadamente 1 μM , aproximadamente 3 μM , aproximadamente 5 μM , o aproximadamente 7 μM . El PU-H71 se puede administrar para proporcionar un $[\text{PU-H71}]_{\text{avg}}$ entre cualquiera de los dos valores anteriores, por ejemplo, un $[\text{PU-H71}]_{\text{avg}}$ (medido entre 0 horas y 336 horas) que varía de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 5 μM , de aproximadamente 3 μM a 7 μM , de aproximadamente 3 μM a aproximadamente 5 μM , etc. En una modalidad, el punto de tiempo "0" es el inicio de un nuevo ciclo de tratamiento. En una modalidad particular, el paciente con el tumor es un paciente humano con un tumor dependiente de HSP90.
- En otra modalidad, la descripción proporciona métodos para tratar un paciente que tiene un tumor sólido, linfoma o malignidad hematológica que comprende administrar una cantidad suficiente de PU-H71 al paciente que proporciona una concentración tumoral promedio de PU-H71 ($[\text{PU-H71}]_{\text{prom}}$) entre 0 y 168 horas de aproximadamente 0.25 μM a aproximadamente 3.75 μM . Por ejemplo, el $[\text{PU-H71}]_{\text{prom}}$ entre 0 y 168 horas puede ser de aproximadamente 0.5 μM , aproximadamente 1.5 μM , aproximadamente 2.5 μM , o aproximadamente 3.5 μM . El PU-H71 se puede administrar para proporcionar un $[\text{PU-H71}]_{\text{prom}}$ entre cualquiera de los dos valores anteriores, por ejemplo, un $[\text{PU-H71}]_{\text{prom}}$ (medido entre 0 horas y 168 horas) que varía de aproximadamente 0.5 μM a aproximadamente 2.5 μM , de aproximadamente 1.5 μM a 3.5 μM , de aproximadamente 1.5 μM a aproximadamente 2.5 μM , etc. En una modalidad, el punto de tiempo "0" es el inicio de un nuevo ciclo de tratamiento. En una modalidad particular, el paciente con el tumor es un paciente humano con un tumor dependiente de HSP90.
- Como se entenderá por una persona experta en el campo, la cantidad total de PU-H71 que necesita ser administrada para lograr la ocupación de "HSP90 oncogénica" deseada, la AUC de tumor o $[\text{PU-H71}]_{\text{prom}}$ es dependiente por tanto la vía de administración como el programa de dosificación. El PU-H71 se puede administrar por varias vías inyectables incluyendo intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitonealmente. Como alternativa, el PU-H71 se puede administrar oralmente.
- En una modalidad de la presente descripción, el PU-H71 se administra intravenosamente a un paciente humano que tiene un tumor sólido, linfoma o malignidad hematológica en una dosificación que varía de aproximadamente 5 mg/m² a aproximadamente 250 mg/m² de acuerdo con un programa de dosificación seleccionado de una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana o cinco veces a la semana. En modalidades particulares, el PU-H71 se administra intravenosamente a un paciente humano en una dosificación de aproximadamente 20 mg/m² a aproximadamente 60 mg/m² de acuerdo con un programa de dosificación seleccionado de una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana, o cinco veces a la semana. En modalidades particulares, el PU-H71 se administra intravenosamente a un paciente

humano en una dosificación de aproximadamente 50 mg/m² a aproximadamente 250 mg/m² de acuerdo con un programa de dosificación seleccionado de una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana o cinco veces a la semana. En otras modalidades, el PU-H71 se administra intravenosamente a un paciente humano en una dosificación de aproximadamente 50 mg/m² a aproximadamente

5 100 mg/m² de acuerdo con un programa de dosificación seleccionado de una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana o cinco veces a la semana. En otras modalidades, el PU-H71 se administra intravenosamente a un paciente humano en una dosificación de aproximadamente 75 mg/m² a aproximadamente 200 mg/m² de acuerdo con un programa de dosificación seleccionado de una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana o cinco veces a la semana. En aún otras 10 modalidades, el PU-H71 se administra intravenosamente a un paciente humano en una dosificación de aproximadamente 75 mg/m² a aproximadamente 150 mg/m² de acuerdo con un programa de dosificación seleccionado de una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana o cinco veces a la semana. En una modalidad particular, el paciente con el tumor es un paciente humano con un tumor dependiente de HSP90.

15 En modalidades preferidas, el PU-H71 se administra intravenosamente a un paciente humano que tiene un tumor sólido, linfoma o malignidad hematológica de acuerdo con un programa de dosificación de una vez a la semana, dos veces a la semana o tres veces a la semana. En una modalidad particular, el PU-H71 se administra intravenosamente en una cantidad que varía de aproximadamente 50 mg/m² a aproximadamente 150 mg/m² o de aproximadamente 70 mg/m² a aproximadamente 125 mg/m² de acuerdo con un programa de dosificación de dos 20 veces a la semana. En otra modalidad particular, el PU-H71 se administra intravenosamente en una cantidad que varía de aproximadamente 20 mg/m² a aproximadamente 100 mg/m² o de aproximadamente 40 mg/m² a aproximadamente 80 mg/m² de acuerdo con un programa de dosificación de tres veces a la semana. En otra modalidad, el PU-H71 se administra intravenosamente en una cantidad que varía de aproximadamente 90 mg/m² a 25 aproximadamente 190 mg/m² o de aproximadamente 100 mg/m² a aproximadamente 250 mg/m² de acuerdo con un programa de dosificación de una vez a la semana. En una modalidad particular, el paciente con el tumor es un paciente humano con un tumor dependiente de HSP90.

30 En una modalidad, el PU-H71 se administra intravenosamente a un paciente humano que tiene un tumor sólido, linfoma o malignidad hematológica de acuerdo con un programa de dosificación de una vez a la semana o dos veces a la semana durante dos semanas seguido por una semana libre. En una modalidad particular, el PU-H71 se administra en un programa de dosificación de una vez a la semana o dos veces a la semana durante una semana seguido por una semana libre. Como alternativa, el PU-H71 se puede administrar una vez la semana o dos veces a la semana sin semanas libres entre las mismas.

5.4. Evaluación de las vías y oncoproteínas dependientes de HSP90 para aplicaciones de pronóstico y de diagnóstico

35 Como se plantea en la Sección 5.1., la información en la relación entre la "HSP90 oncocénica" y la HSP90 normal en las células cancerosas se puede usar para determinar la contribución de la HSP90 en la supervivencia y proliferación de las células cancerosas. Adicionalmente, los inventores han identificado proteínas particulares y vías que dependen frecuentemente de la HSP90 para su supervivencia. La identificación de los niveles de expresión de estas proteínas y/o de estas vías en las células cancerosas de un paciente pueden proporcionar información importante en 40 la función de la proteína de HSP90 en el cáncer del paciente, particularmente cuando se evalúa contra los pacientes que han respondido a la terapia de HSP90. Por consiguiente, la presente descripción proporciona métodos para determinar si un cáncer humano presente en un paciente probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende (a) obtener una muestra que contiene células que expresan la proteína HSP90 del cáncer del paciente; (b) evaluar las células presentes en la muestra de la presencia de por lo menos uno de los siguientes 45 parámetros: una vía AKT activada, un defecto en la función o expresión supresora del tumor PTEN, una vía STAT5 activada, o un miembro de la familia Bcl2, tal como Bcl-xL, expresión proteínica; y (c) comparar la evaluación obtenida en la etapa (b) con una evaluación de referencia predeterminada del mismo parámetro o parámetros evaluados en la etapa (b) para células cancerosas humanas de uno o más pacientes con cáncer quienes 50 respondieron a la terapia con el inhibidor de HSP90 para determinar en consecuencia si el cáncer del paciente probablemente responderá a la terapia con el inhibidor de HSP90. En modalidades particulares, las células son células cancerosas de mama o células de leucemia mieloide aguda (AML).

55 A pesar del gran número de nuevos agentes potenciales que entran en evaluación clínica cada año, solamente 5% a 8% siempre alcanzan el registro. De preocupación particular es la tasa alta de fracasos en la Fase 3, donde un estimado de 50% de agentes de oncología se detienen en el desarrollo. Tales fracasos son especialmente costosos y privan a muchos pacientes de tratamientos potencialmente más efectivos. Estas estadísticas nefastas hablan claramente de las necesidades de descubrir e implementar biomarcadores predictivos de la selección de pacientes y enriquecimiento de los ensayos.

60 ¿Que han aprendido los inventores de los resultados obtenidos en los últimos años con los agentes dirigidos? Cuando un nuevo fármaco se ha administrado, ya sea como un solo agente o en adición a la quimioterapia en una población de estudio no seleccionado por ningún biomarcador, la mayoría de ensayos han producido resultados negativos, mientras que en una minoría pequeña de casos se ha mostrado un beneficio estadísticamente

significativo. Este beneficio, sin embargo, consistió, en el mejor de los casos, en una prolongación absoluta pequeña o moderada de la supervivencia total. Por otra parte, ejemplos de un beneficio absoluto mayor obtenido con el uso de agentes dirigidos basados en una selección de pacientes conducida por biomarcador está constantemente en incremento. Los biomarcadores proporcionan la posibilidad de usar características tumorales y de pacientes para

5 integrar un pronosticador preciso de la eficacia con una terapia basada en mecanismo específico, guiando la selección del tratamiento para cada paciente individual. En particular, un marcador predictivo validado puede identificar prospectivamente individuos que es probable que presenten un resultado clínico positivo de un tratamiento específico.

10 La presente descripción reconoce estos problemas y propone desarrollar y validar biomarcadores para una selección de pacientes conducida por biomarcador y enriquecimiento del ensayo en la implementación de inhibidores de HSP90 en el tratamiento de cánceres.

5.4.1. Marcadores predictivos de la sensibilidad apoptótica a la HSP90 en cáncer de mama

Dependiendo de la constitución genética del tumor, ya sea un efecto citostático o citotóxico puede resultar de la inhibición de HSP90 en BC. En la clínica, sin embargo, una respuesta altamente apoptótica no citostática para el tratamiento es más deseada. De esta manera, para identificar los tumores de cáncer de mama que es más probable que se sometan a la apoptosis cuando se estimulan con PU-H71 y otros inhibidores de HSP90, los inventores han conducido estudios preliminares en líneas de células para identificar lesiones moleculares que se asocian con la respuesta apoptótica más alta en la inhibición de HSP90.

20 Estos estudios proponen una regulación dirigida por HSP90 de Akt activada y Bcl-xL elevadas y/o Mcl-1 como elementos principales que confieren sensibilidad apoptótica de los tumores a la inhibición de HSP90 (es decir, biomarcadores predictivos de respuesta). Una persona experta en el campo apreciará que la medición de una vía Akt activada puede requerir la medición del estado de expresión y/o fosforilación de una o más proteínas asociadas con esta vía, tal como pero no limitado a Akt, S6, PRAS40, Bcl2, mTOR, IKK, NFkB. La información detallada en la vía Akt y su activación se puede encontrar en línea en la base de datos KEGG PATHWAY; y la base de datos de Interacción de Vías Naturales del Instituto de Cáncer Nacional. Véase también los sitios web de Cell Signaling Technology, Beverly, Mass.; BioCarta, San Diego, Calif.; and Invitrogen/Life Technologies Corporation, Clarsbad, Calif. Esta vía está compuesta por, pero no restringida a 4,5-bisfosfato de 1-fosfatidil-D-mio-inositol, 14-3-3, 14-3-3-Cdkn1b, Akt, BAD, BCL2, BCL2L1, CCND1, CDC37, CDKN1A, CDKN1B, citrulina, CTNNB1, EIF4E, EIF4EBP1, ERK1/2, FKHR, GAB1/2, GDF15, Glicógeno-sintasa, GRB2, Gsk3, Ikb, IkB-NfkB, IKK (complejo), ILK, Integrina, JAK, L-arginina, LIMS1, MAP2K1/2, MAP3K5, MAP3K8, MAPK8IP1, MCL1, MDM2, MTOR, NANOG, NFkB (complejo), óxido nítrico, NOS3, P110, p70 S6k, PDPK1, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, PI3K p85, PP2A, PTEN, PTGS2, RAF1, Ras, RHEB, SFN, SHC1 (incluye EG:20416), SHIP, Sos, THEM4, TP53 (incluye EG:22059), TSC1, Tsc1-Tsc2, TSC2, YWHAE.

35 Una persona experta en el campo apreciará que la medición de la expresión de una o más moléculas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, tal como Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 puede ser necesario para apreciar la contribución de esta familia antiapoptótica.

Aunque los estudios en las células BC establecidas proporcionan información valiosa en las BCs que es más probable que respondan a la terapia de HSP90, las células cultivadas no pueden recapitular completamente la enfermedad clínica real. Los modelos experimentales de cáncer de mama abarcan una variedad muy pequeña de 40 líneas de células, que se desarrollaron hace varias décadas. Aunque algunas líneas de células retienen la mayoría de las características originales, los inventores encontraron una discrepancia en los niveles de HSP90 y otras características, entre las muestras de pacientes y las líneas de células, que en parte puede ser una consecuencia del estrés cultural. Además, las líneas de células cultivadas no recapitulan el efecto del entorno que tiene en las 45 células tumorales. En conjunto, los inventores creen que los explantes primarios pueden parecerse a las características del tumor y respuesta al tratamiento con mayor fidelidad que las líneas de células.

De esta manera, para enfrentar la pregunta: "¿Cuál es el espectro de los tumores BC más sensible a la terapia de HSP90?", los estudios de los inventores incluyen la evaluación de PU-H71 en muestras de tumor de cáncer de mama clínicas obtenidas de los desechos de patología sin revelar la identidad del paciente.

50 En estas muestras, los inventores establecieron una relación correlativa entre la sensibilidad de los tumores BC a los inhibidores de HSP90 y la expresión de los biomarcadores seleccionados. La siguiente fase sería moverse hacia adelante y proponer el uso de esto para la selección de pacientes en el siguiente ensayo. Una vez que el sistema de clasificación se define y se valida, la selección de pacientes se podría hacer finalmente en FFPE o CTCs para 55 correlacionar el marcador de interés con la respuesta predictiva. Tales mediciones de diagnóstico luego se pueden introducir como práctica común en la selección de tumores BC que es más probable que respondan a la terapia de HSP90, en la misma forma en que se usa el registro de HER2 para guiar la selección de pacientes para la terapia de Trastuzumab.

Someter a prueba ex vivo la sensibilidad de las muestras BC a PU-H71. Las secciones de tejido recientes de tumores de pacientes con BC se exponen *ex vivo* a PU-H71 para evaluar la sensibilidad total de las células

cancerosas y el efecto en las células normales (es decir vasos, conductos benignos si están presentes en la sección). La concentración de PU-H71 y los tiempos de exposición se basan en los análisis PK tanto *in vitro* como *in vivo* previos con este agente, donde se determinó que hasta las concentraciones micromolares de PU-H71 se administran a y retienen en los tumores 24 h y 48 h después de la administración. La respuesta se determina por una o dos mediciones: 1. cuantificación en las muestras teñidas con H&E de las células que muestran cambios morfológicos indicativos de apoptosis y 2. cuantificación de las células TUNEL positivas.

Obtención de tejidos del paciente: Los desechos de patología de muestras sin revelar la identidad del paciente y biopsias de núcleo de aguja durante los ensayos del inhibidor de HSP90 se obtienen de acuerdo con las directrices y aprobaciones del Institutional Review Board. El tejido recientemente obtenido se usará inmediatamente.

10 **Examen de sensibilidad ex vivo:** Inmediatamente después de la remoción quirúrgica de la muestra de mastectomía, el tejido se transporta al área de Servicios de Obtención de Tejidos (TPS) de la Sala de Patología. Una vez que la lesión se localiza, el tejido se recolecta bajo condiciones estériles. El tamaño de la muestra removida para evaluación es típicamente de 5-10mm x 5-10 mm. Se hace todo lo posible para muestrear el área más viable. Lejos de la lesión, una muestra de tamaño equivalente se remueve representativa del tejido epitelial de mama normal.

15 Ambas muestras se colocan en un medio esencial mínimo (MEM) con 1% de penicilina/estreptomicina. Una porción pequeña de la lesión y la pieza completa del tejido epitelial de mama normal se somete a una congelación "instantánea" para evaluación molecular futura por WB. La porción restante de la lesión (mastectomía) se procesa para evaluación patológica. Para cada lesión la patología proporciona IHC para el estado receptor, marcadores de proliferación, marcadores epiteliales y un portaobjetos teñido con hematoxilina/eosina (H&E) acompañado por 10 no teñidos que se evalúan adicionalmente para biomarcadores no estándares (por ejemplo pAKT, BclxL, HSP90 y Hsp70).

20 A partir de los análisis preliminares los inventores han aprendido que la porción de tejido reciente proporciona un método ex vivo rápido y más eficiente para la evaluación de la inhibición de HSP90 que el aislamiento de células primarias. Además, conserva las células cancerosas en el entorno endógeno del tejido circundante. Esto es importante puesto que la interacción entre las células estromales y las células tumorales se sabe que desempeña una función principal en el crecimiento y progresión del cáncer. En este método, el tejido (es decir, lesión) se coloca en un molde de plástico y se incrusta en agarosa a 6%. El tejido incrustado en agarosa luego se monta en la etapa del Vibratome que se sumerge en un depósito enfriado (para conservación de tejido) que contiene MEM con 1% de penicilina/estreptomicina. El tejido luego se corta en rodajas usando cuchillas de metal que producen secciones en serie de la lesión que son de 200 µm de espesor. Cada sección (menos el medio incrustado en agarosa circundante) se coloca inmediatamente en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos que contienen MEM con 1% de penicilina/estreptomicina. De una pieza de 5mm x 5mm de tejido aproximadamente se producen 25 secciones. Esto permite replicar el análisis de las secciones de tejido tratadas con un mínimo de cuatro dosis del inhibidor de HSP90 y uno con vehículo solamente. Los replicados se pueden someter a ensayo por tanto IHC así como ensayos de viabilidad (lector de placas automático o preparación de citospina) una vez que la sección de tejido se somete a la disociación enzimática por la breve exposición a la dispasa.

25 Hasta la fecha, cuarenta y dos muestras que abarcan todos los subtipos de BC se han adquirido. De estos, nueve fueron de estado receptor negativo. Ambos tumores primarios (PT) y metástasis de ganglios linfáticos (LN) (si está presente) se han evaluado donde "secciones de tejido recientes" de 200 um de espesor se expusieron a dosis cada vez mayores de PU-H71. El tratamiento de carcinoma ductal de infiltración negativo triple (IDC) con PU-H71 logró, en una manera dependiente de dosis, la apoptosis de tanto los tumores primarios como la metástasis de ganglios linfáticos. Interesantemente, la metástasis de LN parece más sensible a PU-H71 que el PT correspondiente. De manera más significativa, el tejido normal (por ejemplo vasos, linfocitos) y benigno (por ejemplo, ductos, lóbulos) permaneció inalterado después de 48 horas de exposición a PU-H71. Los datos muestran un agrupamiento de los casos de TNBC en 4 grupos de sensibilidad distintos: muy sensible, con 100% de apoptosis observada con PU-H71 0.5µM (curva superior, **Figura 40 A**), sensible con 100% de apoptosis con PU-H71 1µM (curva intermedia, **Figura 40 A**), parcialmente resistente con ~50% de apoptosis observada con 1-2.5µM (curva de fondo, **Figura 40 A**) y resistente (PT#14, nada de apoptosis observada con cualquiera de las concentraciones sometidas a prueba, no mostradas).

30 Como se observa en la **Figura 40B**, varios tumores son más sensibles a la inhibición de HSP90 que la predicha de los datos preliminares generados en las líneas de células. Específicamente, mientras que MDA-MB-468 es una de la línea de células cancerosas de mama más sensible (Caldas y colaboradores PNAS 2009), los estudios presentados en esta invención muestran que las células tumorales de sensibilidad mucho más alta a PU-H71 se pueden encontrar en muestra primaria obtenida de pacientes con cáncer de mama humano. Específicamente, mientras que un tratamiento de 48 horas con PU-H71 0.5µM se requiere en las células MDA-MB-468 para observar que aproximadamente 50% de ellas se someten a la apoptosis, los inventores encontraron que para varios cánceres de mama HER2+, triple-negativos y ER+, concentraciones tan bajas como 0.05 µM inducen un efecto similar. Además, mientras que un tratamiento de 48 horas de PU-H71 aproximadamente 5µM es requerido en las células MDA-MB-468 para observar aproximadamente 100% de ellas que se someten a la apoptosis (**Figura 32b**), los inventores descubrieron que para varios cánceres de mama HER2+, triple-negativo y ER+, las concentraciones tan bajas como 0.5 µM inducen un efecto similar. Tales estudios proporcionan información en las concentraciones tumorales requeridas de PU-H71 que se espera que proporcionen un efecto terapéutico.

Las investigaciones de cáncer de GI y pancreático dieron por resultado descubrimientos similares.

5.4.1.1. Investigar la expresión de los biomarcadores propuestos por IHC y WB, y registrar las muestras para la expresión del biomarcador

- 5 Las muestras de los registros IHC se basaron en la expresión baja a alta de HSP90, Hsp70, p-Akt/Akt y Bcl-xL. Los controles negativos adecuados se obtienen al reemplazar el anticuerpo primario con la solución amortiguadora de dilución de anticuerpo. La intensidad de la tinción de HSP90, p-Akt/Akt, Bcl-xL y Hsp70 se registrará (2 veces) para cada muestra en una escala de 0 a 3, en la cual 0 representa tinción negativa, 1 débilmente positiva, 2 moderadamente positiva, y 3 potencialmente positiva mientras que la IHC sola de alguna manera podría ser problemática puesto que el registro es frecuentemente muy subjetivo, su uso en paralelo con un segundo método similar al análisis de Western blot "entrenará" y validará el IHC para hacer correlaciones con la respuesta ex vivo y en pacientes. Si la cantidad de proteína obtenida no es suficiente para la WB de membrana clásica, se usa la tecnología WB capilar ultrasensible. Una muestra de biopsia de aguja de núcleo típica produce entre 20 y 40 mg de tejido, que es suficiente para la IHC propuesta, y potencialmente para el análisis WB capilar. Esta información se analizará en el contexto de la respuesta clínica, que se guía en la validez del método de registro propuesto.
- 10 Particularmente, los inventores tendrán la capacidad de correlacionar la respuesta clínica con la respuesta predicha por la evaluación del biomarcador. Una vez que el sistema de registro se define y se valida, la selección de pacientes se podría hacer finalmente en FFPE para correlacionar el marcador de interés con la respuesta predicha. Tal medición de diagnóstico luego se puede introducir como una práctica común en la selección de tumores TNBC que es más probable que respondan más a la terapia de HSP90, en la misma forma como se usa el registro HER2 para guiar a la selección de pacientes para la terapia de Trastuzumab.
- 15
- 20

Para algunos pacientes, las biopsias no pueden ser posibles, ya sea debido a un tumor inaccesible (metástasis interna profunda) o sin consentimiento otorgado. Para estos casos, los inventores fijarán como objetivo sondear ya sea las células tumorales circulantes (CTCs) recolectadas de la sangre que puede ser de valor informativo. Dependiendo de la etapa de la enfermedad, para pacientes con cáncer avanzado, los inventores esperan recuperar entre 1000 y 10.000 células BC con esa técnica. Este número de células es suficiente para el análisis WB capilar de proteínas (o análisis qPCR en tiempo real, si es necesario) y para el registro de la expresión de HSP90, Hsp70, p-Akt y Bcl-xL por el enriquecimiento inmunomagnético luego de la citometría de flujo.

La **Figura 40** muestra que los tumores de cáncer de mama con Akt activada, como es evidenciado por la tinción alta con fosfo-Akt, Ser473, también son aquellos muy sensibles a la inhibición de HSP90.

30 **5.4.2. Determinantes de la sensibilidad apoptótica a la inhibición de HSP90 en leucemia mieloide aguda (AML)**

35 Las terapias dirigidas que se diseñan para inducir la apoptosis en las células leucémicas son las estrategias antileucemia más prometedoras. Los inventores exploraron los biomarcadores predictivos de la sensibilidad apoptótica a la terapia de la proteína de choque térmico 90 (HSP90) en AML. Los inventores descubrieron que la adición de inhibidores de HSP90 a un panel de líneas de células AML genéticamente distintas inhibieron potencialmente el crecimiento celular e indujeron la degradación de varias oncoproteínas específicas de células AML tales como FLT3 mutante, TEL-TRKC, AML1-ETO, c-KIT mutante y JAK2 mutante. Notablemente, la propensión para estas células a que se sometan a la apoptosis tras la inhibición de HSP90 varió considerablemente. Las líneas de células más sensibles fueron células MOLM-13, MV-4-11 y M0-91, y para cada una de estas líneas de células los inventores observaron cerca de 100% de exterminio de la población de células inicial después de 48-72 h del tratamiento con el inhibidor de HSP90. En contraste, solamente 20% de muertes se observaron en las células HEL HL-60 bajo estas condiciones. Después los inventores hicieron uso de inhibidores específicos de vías de señalización oncogénicas conocidas por ser desreguladas en AML para mostrar la sensibilidad apoptótica de las células AML a la inhibición de HSP90 correlacionada con la activación de PI3K-Akt y STAT5, pero no con la activación de la vía Raf-MAPK. De manera importante, se observaron resultados similares en las líneas de células, modelos de xenoinjerto y sistemas de líneas de células isogénicas. También los inventores descubrieron que la activación doble de estas dos vías, aún en el contexto de la sobreexpresión de Bcl-xL, reduce el umbral apoptótico de la AML cuando se inhibe la HSP90. Tomados conjuntamente, los descubrimientos de los inventores sugieren que los pacientes con AML con activación de la señalización de Akt y STAT5 es más probable que se beneficien de la terapia de inhibidor de HSP90, y los ensayos clínicos deben fijar como objetivo enrolar pacientes con activación específica de estas vías de señalización importantes.

50 De manera importante, 50-70% de pacientes con AML muestran fosforilación de tanto Thr308 como Ser473 Akt. Esta molécula contribuye a la proliferación, supervivencia y resistencia a fármacos en AML, y se asocia con el resultado adverso. Tomados conjuntamente, los descubrimientos de los inventores sugieren que los pacientes con AML con activación de la señalización de AKT y STAT5 es más probable que se beneficien de la terapia de inhibidor de HSP90, y los ensayos clínicos deben fijar como objetivo enrolar pacientes con activación específica de estas vías de señalización importantes.

5.4.2.1. La inhibición de HSP90 induce el exterminio específico de tipo de células en líneas de células de AML

Una variedad de inhibidores de HSP90 de molécula pequeña químicamente distintos se ha reportado, y varios se encuentran en la investigación clínica o preclínica de etapa tardía (Chiosis y colaboradores, 2008). Entre estos se encuentran los derivados del producto natural de ansamicina 17-AAG y 17-DMAG, y los compuestos sintéticos CNF-2024 (BIIB021) y PU-H71, todos en evaluación clínica, y PU-DZ13, un derivado cercano de PU-H71 en el desarrollo preclínico.

Para evaluar el espectro de sensibilidad de las líneas de células AML a los inhibidores de HSP90, y para investigar una posible relación entre sus antecedentes genéticos y la inducción de la apoptosis por la terapia de HSP90, los inventores hicieron uso de un panel de células variadas. Específicamente, los inventores eligieron las líneas de células Kasumi-1 y SKNO-1, que contienen la fusión AML1-ETO y las proteínas c-KIT (N822K) mutadas; MOLM-13, una línea de células humana establecida de la sangre periférica de un paciente en la recaída de AML que había evolucionado de MDS, que contiene tanto la proteína de fusión MLL-AF9 como la mutación FLT3 ITD; M0-91 que contiene la proteína de fusión TEL-TRKC y también aloja una STAT5 constitutivamente activada; y finalmente, HEL que contiene la mutación JAK2 V617F. Los inhibidores de HSP90 inhibieron potencialmente, en una manera dependiente de la dosis y células el crecimiento de cada línea de células AML sometida a prueba y también indujeron el exterminio celular, con diferencias notables observadas entre las líneas de células. Las más sensibles fueron las células MOLM-13 y M0-91 donde el 100% del exterminio de la población de células inicial se observó después de 72 h, seguido por Kasumi-1 y SKNO-1, con 50-80% y HEL con 20%. Los leucocitos de sangre periférica normales no se vieron afectados en concentraciones similares.

La capacidad de los inhibidores de HSP90 distintos para exterminar las líneas de células AML fue similar, sugiriendo que la citotoxicidad de los compuestos se presenta a través de un mecanismo común de acción, particularmente inhibición de HSP90.

5.4.2.2 La inhibición de HSP90 induce la apoptosis en las células AML

El PU-H71 se eligió de esta manera para investigar adicionalmente los mecanismos responsables del exterminio de células AML por los inhibidores de HSP90. Como es evidenciado por la tinción de anaranjado acridina/bromuro de etidio doble, la escisión PARP y la activación de la caspasa 3,7, la citotoxicidad de PU-H71 en AML se presentó principalmente a través de la inducción de la apoptosis. El número de células que se someten a la apoptosis después de 72 h de tratamiento con PU-H71, se acercó a 100% para MOLM-13 y M0-91, 50-60% para SKNO-1 y Kasumi-1, y 30% para HEL, valores muy de acuerdo con el exterminio de células observado. Se observó un incremento de diez veces, en MOLM-13 y M0-91, y dos veces, en Kasumi-1 y SKNO-1, en la activación de la caspasa-3,7 tan temprano como a las 24 h. Esencialmente, no se detectaron células vivas para la línea de células M0-91 después de 48 h del tratamiento con el inhibidor de HSP90. En la mayoría de células sensibles, MOLM-13 y M0-91, la apoptosis se asoció con la regulación por decremento de la molécula antiapoptótica Bcl-xL.

5.4.2.3. La inhibición de HSP90 agota las oncoproteínas AML claves pero este efecto no se correlaciona con la sensibilidad apoptótica

La sensibilidad apoptótica distinta de las líneas de células AML hacia los inhibidores de HSP90 podría ser debido a la inhibición de HSP90 efectiva en ciertas líneas de células pero ineficaz en otras. Para probar esta hipótesis, los inventores evaluaron el efecto de PU-H71 en dos proteínas que demostraron ser dependientes de HSP90 en una mayoría de cánceres, las cinasas RAF-1 y AKT. La dosis del inhibidor de HSP90 redujo de manera dependiente de la dosis y de manera marcada los niveles de estado permanente de estas proteínas en todas las células sometidas a prueba. Esto coincide con el mecanismo establecido mediante el cual la HSP90 es requerida para la estabilidad y función de estas cinasas en las células cancerosas.

Además de estas proteínas cliente HSP90 “pan-cáncer”, el PU-H71 también condujo a la degradación de los conductores de leucemogénesis específica, tales como el FLT3 mutante en MOLM-13, TEL-TRKC en M0-91, AML1-ETO y cKIT mutante en Kasumi-1 y SKNO-1, y JAK2 mutante en HEL (*onco-clientes HSP90 específicos de células AML*). El FLT3, cKIT y JAK2 mutantes, y la proteína de fusión AML1-ETO se reportaron previamente por ser sensibles a la inhibición de HSP90 en AML u otras células transformadas. La proteína de fusión TEL-TRKC, sin embargo, es un cliente novedoso de HSP90, como se indica por los descubrimientos de los inventores que muestran la potente degradación de TEL-TRKC por PU-H71 en la línea de células M0-91.

Colectivamente, los descubrimientos de los inventores indican que los inhibidores de HSP90 agotan las células AML de las proteínas de conducción de malignidad clave, incluyendo los “dos aciertos” postulados por ser eventos necesarios para la leucemogénesis, pero ninguna correlación es evidente entre este efecto y la capacidad de los inhibidores de HSP90 de inducir la apoptosis en las células AML.

5.4.2.4. La sensibilidad apoptótica a la inhibición de HSP90, las vías PI3K/AKT y JAK/STAT se solapa en las células AML

Debido a que una relación entre la constitución genética y la sensibilidad apoptótica a la inhibición de HSP90 no es evidente, una respuesta potencial podría situarse en las diferencias funcionales que conducen a un fenotipo antiapoptótico o en una expresión diferencial de ciertas moléculas antiapoptótica entre estas células. Tres vías principales se han ligado a la regulación de la apoptosis en AML: las vías PI3K/AKT/NFKB, las vías JAK/STAT y las

vías ras/MAPK. Más importantemente, el HSP90 regula varias moléculas claves a lo largo de estas vías, y la inhibición de HSP90 puede realizarse a una inhibición combinatoria de estas moléculas, tales como p-AKT, p-STAT y p-ERK.

Para investigar la importancia de las vías individuales de la apoptosis en las líneas de las células AML, se usaron 5 moléculas pequeñas específicas, tal como el inhibidor de Akt VIII, un compuesto de quinoxalina que inhibe potencial y selectivamente la actividad de Akt1/Akt2 (AKTi), el inhibidor MEK de MAP cinasa PD98059 (MEKi) y el inhibidor pan-jak2-(1,1-Dimetiletil)-9-fluoro-3,6-dihidro-7H-benz[h]-imidaz[4,5-f]isoquinolin-7-una(JAKi)). Los inventores 10 también expandieron la acumulación de células AML por la adición de tres líneas adicionales: HL-60, una línea de células promielíticas ampliamente estudiadas positivas para la expresión del oncogén myc, THP-1, una línea de células que provino de la sangre periférica de un bebé de un año de edad varón con AML monocítico, y MV4-11 una 15 línea de células que contiene una translocación 4;11 y una mutación FLT3 ITD.

El número de células apoptóticas tras el tratamiento con los inhibidores de AKT, JAK y MEK (AKTi, JAKi y MEKi) y el 20 inhibidor de HSP90 PU-H71, se cuantificó a 24, 48 y 72 h después de la adición de los inhibidores específicos. La inducción leve o poca de la apoptosis se presentó tras la adición del inhibidor MEK. Los inhibidores AKT y JAK por otra parte, tuvieron efectos variables pero potentes en la apoptosis. El análisis de la apoptosis indicó que las células sensibles a AKTi también fueron los más probables a someterse a la apoptosis cuando la HSP90 se inhibió (inclinación = 0.9023 ± 0.09572), sugiriendo que la sensibilidad apoptótica a la inhibición de la HSP90 se correlaciona potencialmente con la sensibilidad a la inhibición de la vía PI3K/AKT en AML. La correlación entre la vía JAK/STAT y la inhibición de HSP90 también fue buena (inclinación = 0.8245 ± 0.1490), aunque las dos líneas de 25 células, MV4-11 y THP-1 fueron claros perfiladores. Estos descubrimientos sugieren que la adicción de células AML para la supervivencia en cualquiera de ambas vías PI3K/AKT y JAK/STAT se correlaciona con e indica potencialmente la sensibilidad apoptótica a la inhibición de HSP90.

5.4.2.5 La cinética y potencia de la inhibición *in vivo* de la inhibición de AKT y STAT5 SP90 se correlacionan con la apoptosis tumoral

25 Los inventores después analizaron los efectos farmacodinámicos de la inhibición de HSP90 en tumores tanto HEL como M0-91 xenoinjertados en ratones. A diferencia de las células cultivadas, el uso del modelo *in vivo* permite la supervisión en tiempo real de la inhibición de las vías dependientes de HSP90. Debido a que las vías más dependientes de HSP90 también son más sensibles a su inhibición farmacológica, permanecen inhibidas por PU-H71 durante el período de tiempo más prolongado en los tumores. Por consiguiente, en los tumores M0-91 que alojan la p-AKT elevada y p-STAT5, y parece que son adictos a la activación de ambas vías, el PU-H71 indujo la apoptosis marcada. La apoptosis en M0-91 duró 96 horas después de la administración de una dosis de PU-H71, reflejando la inhibición potente de tanto AKT como STAT. El nivel más alto de PARP escindida se observó en el intervalo de 12-72 h posterior a la administración de PU-H71, cuando los niveles tanto de p-AKT como p-STAT5 se redujeron por 70 al 100% de los niveles iniciales. El efecto de PU-H71 en PARP disminuyó por 96 horas, cuando el 30 p-AKT, pero no el p-STAT5, recuperó los niveles de la línea base.

35 Los tumores de xenoinjerto HEL fueron menos sensibles que los tumores M0-91 a la inducción de la apoptosis por PU-H71. Bajo las condiciones de cultivo, las células HEL expresan p-STAT5 elevado, y la inhibición de las vías JAK/STAT por el JAKi o por PU-H71 hace que 20-30% de las células se sometan a la apoptosis. La AKTi, por otra parte tiene poco o nada de efecto en estas células. Por consiguiente, la escisión de PARP limitada y la activación de caspasa-3 se observa tras la inhibición de HSP90 en estas células.

40 No obstante, y en contraste con el cultivo de tejido, cuando se xenoinjertan en ratones desnudos, las células HEL muestran un nivel de expresión bajo a moderado de p-AKT. Esto no es sorprendente, ya que se reportó que la actividad de AKT se puede estimular en las células AML por el entorno, tales como citocinas, y los tumores *in vivo* pueden ser más adictivos a la actividad de AKT para la supervivencia debido a los factores de estrés únicos al tejido tumoral, tal como hipoxia, acidez y vascularización anormal. La elevación de la actividad de AKT en las células de HEL xenoinjertadas parece que es necesaria para la supervivencia del tumor debido a que el PU-H71 induce notablemente la apoptosis más alta en los tumores HEL que en las células HEL cultivadas. Como con los tumores M0-91, el nivel más alto de PARP escindido se observó cuando tanto los niveles de p-AKT como de p-STAT5 se redujeron por PU-H71 de 70 a 100% de los niveles iniciales (en el intervalo de 12-48 h posteriores a la 45 administración de PU-H71). La escisión de PARP disminuyó significativamente cuando p-AKT pero no p-STAT5 recuperó los niveles de la línea base (72 h).

50 Colectivamente, los datos de los inventores sugieren que la actividad apoptótica de los inhibidores de HSP90 en AML se correlaciona con y es una medición de regulación por decremento de las especies p-AKT y p-STAT5 activadas. Además de la p-Akt [es decir Ser 473] el estado de activación de la vía Akt se puede determinar como una medición del estado de fosforilación de S6, s6k o mTOR, también regulado por decremento por el tratamiento con PU-H71. Las observaciones también implican que la adicción aditiva de las células AML a la activación de la vía AKT y STAT también las vuelve más sensibles a la inhibición de HSP90.

5.4.2.6. La inhibición de HSP90 induce la apoptosis en las células adictivas para supervivencia en las vías PI3K/AKT y JAK/STAT

- Para mostrar esta hipótesis los inventores hicieron uso de líneas de células isogénicas FL5.12. La FL5.12 se derivó de una línea de células dependiente de interleucina-3 (IL-3) con una vía JAK/STAT funcional y tiene rasgos característicos de un progenitor linfocítico temprano. Tanto las células parenterales como las células transfectadas expresan niveles moderados de AKT y STAT5 activas, como es evidenciado por la fosforilación de AKT de la fosforilación de Ser473 y STAT5 en Tyr694, respectivamente. El nivel de p-STAT5 pero no p-AKT es dependiente de la presencia de IL-3. La introducción de una forma miristoilada, constitutivamente activada de AKT (mAKT) bajo el control de un promotor inducible por doxiciclina (DOX) permite además la regulación de los niveles de p-AKT en estas células. En conjunto, estas células son un buen modelo isogénico para evaluar la dependencia de la sensibilidad apoptótica del inhibidor de HSP90 en las vías AKT y STAT5 activadas.
- 5 Cuando las células transfectadas por mAKT se trataron con la AKTi, se observó un incremento en las células apoptóticas de 5-7% a 15-20%. Este valor refleja la contribución de la p-AKT endógena a la supervivencia de estas células. Cuando la actividad de AKT se incrementó por la adición de DOX, las células fueron más adictivas al AKT para la supervivencia y la AKTi condujo a 30% de células apoptóticas ($P = 0.015$).
- 10 Cuando las células transfectadas con mAKT se trataron con el inhibidor de HSP90, aproximadamente 35-40% de células apoptóticas se detectaron. Este valor refleja la contribución combinada de la p-AKT y p-STAT5 endógenas a la supervivencia de estas células. El incremento adicional en los niveles de p-AKT por Dox, condujo a un incremento en las células apoptóticas de 35-40 a 50% en la adición de PU-H71.
- 15 Juntos estos descubrimientos muestran que la sensibilidad apoptótica de las células AML a los inhibidores de HSP90 es un reflejo de la adición de las células para la supervivencia en las vías AKT y STAT.
- 20 **5.4.2.7. La sobreexpresión de Bcl-xL no logra inhibir el efecto apoptótico de la inhibición de HSP90 en AML**
- Los niveles constitutivamente altos de Bcl-xL se han asociado con la resistencia de células de leucemia a varias categorías de agentes quimioterapéuticos. Los inventores por lo tanto investigaron si la introducción de Bcl-xL podría superar la dependencia de las células transfectadas con FL5.12 para la supervivencia en AKT y STAT y las volverían resistentes a la inhibición de estas vías por PU-H71. Para investigar esta hipótesis, los inventores hicieron uso de células FL5.12.mAKT transfectadas establemente con un vector de expresión que contiene el inhibidor apoptótico Bcl-xL. Estas células permanecieron dependientes de IL-3 para la proliferación in vitro. En estas células, similar a las células M0-91, se observó una activación concomitante de las vías STAT5 y AKT y la sobreexpresión de Bcl-xL. Como el caso en M0-91, la inhibición de HSP90 por PU-H71 condujo a la reducción en la actividad y niveles de estado permanente de estas proteínas y retuvo su efecto apoptótico.
- 25 **5.4.2.8. Planteamiento**
- A pesar del gran número de nuevos agentes potenciales que entran en evaluación clínica cada año, solamente del 5% al 8% logran registrarse. De preocupación particular es la alta tasa de fracasos en la Fase 3, donde una estimación del 50% de agentes de oncología se detienen en el desarrollo. Tales fracasos son especialmente costosos y privan a muchos pacientes de tratamientos potencialmente más efectivos. Estas estadísticas nefastas hablan claramente de la necesidad de descubrir e implementar biomarcadores predictivos para la selección de pacientes y enriquecimiento de ensayos. El estudio de los inventores enfrenta este problema en AML e indica que la sensibilidad apoptótica a la inhibición de HSP90 se correlaciona con la adicción acumulativa de las células para la supervivencia en las vías de señalización con funciones antiapoptóticas. Los inventores identifican la Akt y STAT activadas como vías principales en este aspecto.
- 30 La señalización de AKT se activa frecuentemente en blastocitos de pacientes con AML aguda y contribuye en gran medida a la proliferación, supervivencia y resistencia a fármacos de estas células. De 50 a 70% de pacientes con AML muestran fosforilación de tanto Thr308 como Ser473 AKT. Tanto la supervivencia libre de enfermedad como la total para pacientes que muestran activación de AKT fue significativamente más corta cuando se comparó con pacientes sin activación de AKT, sugiriendo colectivamente que la inactivación de AKT puede ser una estrategia potente en AML. La HSP90 regula esta vía y varios de sus elementos claves, probablemente de una manera dependiente de la transformación. Por consiguiente, se observó una correlación significativa entre la expresión de HSP90 y aquella de pAKT en células de leucemia mieloide aguda primaria (AML), sugiriendo que la sobreexpresión de HSP90 es necesaria en la célula de AML para amortiguar la actividad incrementada y dependencia de la célula en la vía AKT.
- 35 La activación de STAT constitutiva también se presenta en aproximadamente 70% de las muestras de AML. La activación de STAT en las células de AML se ha asociado con, pero no restringido a, FLT3 ITDs y una estimulación autocrina de IL-6. Sin embargo, otros moduladores cadena arriba de las vías STAT también pueden desempeñar una función en la activación de STAT. De hecho, las mutaciones KIT también se han descubierto que activan las vías JAK/STAT. Los casos de AML con alta fosforilación de STAT5 y FLT3 mostraron, en general, un porcentaje menor de apoptosis espontánea, comparada con los blastocitos de AML sin fosforilación de STAT5 espontánea. Las translocaciones que implican los genes de JAK/STAT proporcionan otra ligación entre la activación de STAT y la leucemogénesis. La translocación t(9;12), que combina el dominio de oligomerización del gen TEL con el dominio catalítico de JAK2, se ha descubierto tanto en la leucemia linfocítica como mieloide. Esta translocación activa
- 40
- 45
- 50
- 55

constitutivamente los efectores cadena abajo tal como STAT5 e induce el crecimiento independiente de citocina en los modelos de transfección. Como se reporta previamente y también se muestra en la presente, varias de estas proteínas de activación de STAT requieren la HSP90 para facilitar su actividad aberrante.

5 Tomados conjuntamente, la adicción para la supervivencia de clones de AML agresivos en varias vías de activación y moléculas, tales como AKT y STAT5, las vuelve también más adictivas a la HSP90. La inhibición de HSP90 de esta manera, se vuelve más efectiva en el exterminio de estas células. Los descubrimientos de los inventores también sugieren que la sobreexpresión concomitante de la Bcl-xL antiapoptótica en el contexto de la AKT y la STAT5 activada no altera significativamente la sensibilidad de estas células hacia HSP90. La sobreexpresión de Bcl-xL es un contribuidor principal a la resistencia a fármacos en AML. La sobreexpresión de las proteínas apoptóticas de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x(L)) provoca resistencia a fármacos a 122 agentes de quimioterapia "estándar" y se asocia con un resultado clínico peor en pacientes con AML.

10 En conclusión, los descubrimientos de los inventores sugieren que los pacientes con AML con activación de la señalización de AKT y STAT5 es más probable que se beneficien de la terapia del inhibidor de HSP90 (véase las Figuras 41 y 42) y los ensayos clínicos deben fijar como objetivo el enrolamiento de pacientes con activación 15 específica de estas vías de señalización importantes. Los descubrimientos de los inventores también sugieren que la introducción de inhibidores de HSP90 se garantiza en combinación con otros tratamientos en las AMLs que sobreexpresan Bcl-xL, como un medio para reducir su umbral apoptótico.

5.5. Uso de inhibidores de HSP90 radioetiquetados para seleccionar pacientes neurodegenerativos quienes serán susceptibles a la terapia de inhibición de HSP90

20 El uso de inhibidores de HSP90 radioetiquetados para seleccionar pacientes quienes serán susceptibles a la terapia de inhibición de HSP90 se describe en la Sección 5.2.1. Metodología similar se puede usar para identificar pacientes que padecen enfermedades neurodegenerativas que es probable que respondan a la terapia de HSP90. Por consiguiente, la descripción proporciona un método para determinar si un paciente que padece una enfermedad neurodegenerativa probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes 25 etapas:

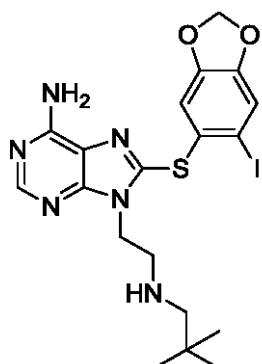
- (a) poner en contacto el cerebro con un inhibidor de HSP90 radioetiquetado que se liga de manera preferente a una forma patogénica de HSP90 presente en células del cerebro del paciente;
- (b) medir la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado ligado a las células del cerebro en la muestra; y
- (c) comparar la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado ligado a las células del cerebro en la muestra medida en la etapa (b) a una cantidad de referencia;

30 en donde una mayor cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado ligado a las células del cerebro medida en la etapa (b) comparado con la cantidad de referencia indica que el paciente probablemente responderá al inhibidor de HSP90.

35 En una modalidad la referencia es de las células del mismo paciente con las enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, los inventores han determinado que las neuronas normales tienen poco o nada de "HSP90 patogénica": Por consiguiente, la cantidad de referencia se puede determinar usando neuronas normales del paciente en una región del cerebro no afectada. En otra modalidad, la referencia puede ser de células de un individuo sano. En otra modalidad, la cantidad de referencia se puede medir a partir de una población de estudio de individuos sanos.

40 Tanto la transformación maligna como la neurodegeneración, como se presenta en la enfermedad de Alzheimer, mal de Parkinson, demencia frontotemporal y otras demencias, atrofia muscular medular y bulbar son procesos de múltiples etapas complejas y prolongados caracterizados por expresión anormal, modificación posterior a la traducción y procesamiento de ciertas proteínas. Para mantener y permitir la acumulación de estos procesos desregulados, y para facilitar la evolución escalonada del fenotipo de la enfermedad, las células deben cooptar por un mecanismo regulador compensatorio. En el cáncer, esta función se ha atribuido a la proteína de choque térmico 45 90 (HSP90). En este sentido, en el nivel fenotípico, la HSP90 parece que sirve como un amortiguador bioquímico para las numerosas lesiones específicas de cáncer que son características de diversos tumores. Una función similar existe para la HSP90 en la neurodegeneración y de esta manera el ensayo de PET descrito en la Sección 5.2.1. se puede usar para identificar la "HSP90 patogénica" en el cerebro enfermo. La "HSP90 patogénica" en la enfermedad neurodegenerativa desempeña una función similar a la "HSP90 oncogénica" en el cáncer. El uso de inhibidores de 50 HSP90 para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas se describe en la Solicitud Publicada de E.U.A. No. 2009/0298857.

55 Dado que el inhibidor de HSP90 PU-HZ151 muestra alta afinidad de ligación a la HSP90 del cerebro neurodegenerativa, es capaz de inducir en gran medida los niveles de HSP70, y se estima que es permeable al cerebro, los inventores la seleccionaron para la evaluación *in vivo* adicional. El PU-HZ151 se describió en la WO 2008/005937 y tiene la siguiente estructura química:

**PU-HZ151**

De hecho, cuando se administró intraperitonealmente a ratones 3xTg AD, el PU-HZ151 dio por resultado una modulación objetivo significativa como se mostró por la inducción de HSP70 en el hipocampo (**Figura 43A**). El efecto fue dependiente de la dosis (**Figura 43B**) con una inducción significativa de HSP70 detectada tan baja como 5 10mg/kg de la dosis administrada.

Después los inventores determinaron en el cerebro y el plasma de ratones 3xTg AD, los niveles del inhibidor de HSP90 asociados con estos efectos farmacodinámicos (**Figura 43C**). Cuando se administró intraperitonealmente 50 mg/kg a ratones 3xTg, los niveles de PU-HZ151 en la corteza alcanzaron $3.3 \pm 0.9 \text{ } \mu\text{g/g}$ (~5,000 nM) a las 4h, $0.05 \pm 0.08 \text{ } \mu\text{g/g}$ (~170 nM) a las 12h, $0.02 \pm 0.03 \text{ } \mu\text{g/g}$ (~60 nM) a las 24h y $0.02 \pm 0.02 \text{ } \mu\text{g/g}$ (~53 nM) a las 48h 10 después de la administración. En comparación, el PU-DZ8, un inhibidor de HSP90 menos efectivo, administrado en una dosis similar (75 mg/kg) alcanzó una concentración del cerebro de solamente $0.35 \text{ } \mu\text{g/g}$ (~700 nM) a las 4h y $0.2 \text{ } \mu\text{g/g}$ (~390 nM) a las 12h, y no se detectó en la corteza a las 24 horas después de la administración.

En el plasma, el PU-HZ151 alcanzó $2.1 \pm 0.1 \text{ } \mu\text{g/g}$ (~4000 nM) a las 4h, pero fue indetectable más allá de las 8h. La exposición de la corteza a PU-HZ151 durante el intervalo de 0 a 48h, como es medido por el área bajo la curva (AUC), fue 2.5 veces más alta que aquella del plasma (17.5 contra $7.1 \text{ } \mu\text{M}\cdot\text{h}$). Los niveles en el cerebelo (región del cerebro no afectada por la enfermedad en este modelo) se equipararon con aquellos de plasma más cercanos que aquellos registrados en la corteza (región del cerebro enfermo en este modelo). Esta observación también es apoyada por la retención prolongada del inhibidor PU-HZ151 más de 48h después de la administración en esta 20 región del cerebro, los descubrimientos similares a aquellos obtenidos con los inhibidores de esta clase, tal como PU-H71, en los tumores.

El ^{124}I -PU-HZ151 y otros inhibidores de HSP90 radioetiquetados por lo tanto se pueden usar para seleccionar pacientes afectados por una enfermedad neurodegenerativa dependiente de HSP90 e identificar aquellos que se benefician más probablemente de tal terapia. También se pueden usar en una forma similar a PU-H71 en el cáncer, para determinar la exposición patogénica del cerebro al inhibidor de HSP90 y determinar una dosis y programa de 25 administración óptimos.

Una persona experta en el campo puede apreciar que los usos descritos por esta invención para PU-H71 en el cáncer se pueden lograr en las enfermedades neurodegenerativas así como un Inhibidor de HSP90 permeable al cerebro, radioetiquetado.

6. Materiales y Métodos

30 6.1. Métodos Sintéticos

6.1.1. Síntesis de Sondas Fluorescentemente Etiquetadas

Se registraron espectros ^1H RMN en un instrumento Bruker de 500 o 600 MHz. Los cambios químicos se reportan en valores δ en ppm campo debajo de TMS como el estándar interno. Los datos ^1H se reportan como sigue: cambio químico, multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, br = amplio, m = multiplete), integración constante de acoplamiento (Hz). Se registraron espectros de masa de alta resolución en un sistema Waters LCT Premier. Se obtuvieron espectros de masa de baja resolución en una LC de Ultra Desempeño Waters Acquity con ionización de electropulverización y detector SQ. Se realizaron análisis de cromatografía líquida de alto desempeño 35 en un sistema Waters Autopurification con PDA, MicroMass ZQ, y detector ELSD, y una columna de fase inversa (Waters X-Bridge C18, 4.6 x 150 mm, 5 μm) usando un gradiente de; método A (a) $\text{H}_2\text{O} + \text{TFA}$ al 0.1% y (b) $\text{CH}_3\text{CN} + \text{TFA}$ al 0.1%, 5 hasta 95% b durante 10 minutos en 1.2 mL/min; método B (a) $\text{H}_2\text{O} + \text{TFA}$ al 0.1% y (b) $\text{CH}_3\text{CN} + \text{TFA}$ al 0.1%, 5 hasta 95% b durante 13 minutos en 1.2 mL/min. Se realizó cromatografía de columna usando gel de 40 sílice de malla 230-400 (EMD). Todas las reacciones se realizaron bajo protección de argón. El isotiocianato de

fluoresceína (FITC), cloruro de sulfonil sulfurodamina 101 (Rojo Texas-Cl) y 4-cloro-7-nitro-1,2,3-benzoxadiazol (NBD-Cl) se adquirieron de Aldrich.

PU-H71-FITC1 [4] (Esquema de reacción 1). Compuesto **3²¹** (15 mg, 0.0263 mmol), FITC (11.3 mg, 0.0289 mmol) y Et₃N (0.1 mL) en DMF (0.2 mL) se agitó durante 12 h a ta. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por HPLC para dar 10.1 mg (40%) de **4**. ¹H RMN (500 MHz, MeOH-d₄) δ 8.17 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.65-7.74 (m, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.08-7.16 (m, 2H), 6.76-6.89 (m, 2H), 6.66 (s, 2H), 6.50-6.59 (m, 2H), 6.02 (s, 2H), 4.35 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.96 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.78 (br s, 2H), 3.62 (br s, 2H), 2.31 (m, 2H), 1.77 (m, 2H), 1.69 (m, 2H), 1.45 (m, 4H); HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculado para C₄₂H₄₀IN₈O₇S₂, 959.1506; encontrado 959.1530; HPLC (método A) T_r = 4.52 (96%).

PU-H71-Rojo Texas [5]. Compuesto **3²¹** (4.6 mg, 0.008 mmol) en DMF (0.25 mL) se enfrió hasta 0°C por baño de hielo/agua. Luego se agregó cloruro de sulfonil sulfurodamina 101 (3 mg, 0.005 mmol) y la solución se agitó durante 12 h, permitiendo que la temperatura lentamente se eleve desde 0 hasta 10°C. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC para dar 3.4 mg (61%) de **5** como un sólido púrpura oscuro. ¹H RMN (500 MHz, MeOH-d₄) δ 8.56 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.16 (dd, J = 1.6, 7.9 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.46 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.58 (s, 2H), 6.08 (s, 2H), 4.47 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.56 (t, J = 5.4 Hz, 4H), 3.52 (t, J = 5.6 Hz, 4H), 3.15 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.08 (m, 4H), 3.01 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.93 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.68 (m, 4H), 2.35 (m, 2H), 2.11 (m, 4H), 1.90-2.00 (m, 4H), 1.66 (m, 2H), 1.27-1.45 (m, 6H); HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculado para C₅₂H₅₇IN₉O₈S₃, 1158.2537; encontrado 1158.2534; HPLC (método B) T_r = 9.40 (99%).

PU-H71-NBD1 [8] (Esquema 1). Se disolvieron el compuesto **6²¹** (12.2 mg, 0.0229 mmol) y **7²²** (32 mg, 0.1145 mmol) en DMF (0.4 mL) y agitaron a ta durante 20 h. Se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 7.9 mg (47%) de **8**. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄) δ 8.32 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.04 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.89 (s, 2H), 4.13 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.32 (m, 2H), 2.51 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.47 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.94 (m, 2H), 1.63 (m, 2H), 1.36-1.45 (m, 2H), 1.21-1.35 (m, 4H); HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₃₀IN₁₀O₅S, 733.1166; encontrado 733.1171; HPLC (método B) T_r = 8.80 (98%).

PU-H71-FITC2 [9] (Esquema 2). El compuesto **2²³** (16.7 mg, 0.0326 mmol), FITC (14.0 mg, 0.0359 mmol) y Et₃N (0.1 mL) en DMF (0.2 mL) se agitó durante 5 h a ta. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por HPLC para dar 21.2 mg (72%) de **9**. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8.15 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.77 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.09 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.63-6.71 (m, 4H), 6.51 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 6.02 (s, 2H), 5.53 (br s, 2H), 4.30 (br s, 2H), 3.64 (br s, 2H), 2.85 (br s, 1H), 2.27 (m, 2H), 1.23 (d, J = 6.2 Hz, 6H); HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculado para C₃₉H₃₃IN₇O₇S₂, 902.0928; encontrado 902.0942; HPLC (método B) T_r = 9.90 (99%).

PU-H71-NBD2 [10]. El compuesto **2²³** (25.4 mg, 0.050 mmol), NBD-Cl (10.0 mg, 0.05 mmol) y Et₃N (7.6 μL, 0.055 mmol) en DMF (0.35 mL) se agitó durante 12 h a ta. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por CCD preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 25:1) para dar 13.4 mg (40%) de **10**. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄) δ 8.25 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.07 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 5.87 (s, 2H), 4.24 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.74 (m, 2H), 3.18 (m, 1H), 2.12 (m, 2H), 1.22 (d, J = 6.5 Hz, 6H); HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculado para C₂₄H₂₃IN₉O₅S, 676.0588; encontrado 676.0593; HPLC (método B) T_r = 10.37 (99%).

2-(3-(6-amino-8-(6-yodobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)purin-9-il)propil)isoindolin-1,3-diona [12] (Esquema 3). Se disolvió 50 mg (0.121 mmol) del Compuesto **11²³** en DMF (2 mL). Se agregaron 43.4 mg (0.1331 mmol) de Cs₂CO₃ y 162 mg (0.605 mmol) de N-(3-bromopropil)-ftalimida y la mezcla se agitó a ta durante 30 minutos. Luego se agregó Cs₂CO₃ adicional (8 mg, 0.0242 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Luego se agregó Cs₂CO₃ adicional (8 mg, 0.0242 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH:AcOH, 15:1:0.5) para dar 25 mg (34%) de **12**. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (s, 1H), 7.85 (dd, J = 3.0, 5.5 Hz, 2H), 7.74 (dd, J = 3.0, 5.4 Hz, 2H), 7.11 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.10 (br s, 2H), 6.00 (s, 2H), 4.27 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.77 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.15 (m, 2H); HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₁₈IN₆O₄S, 601.0155; encontrado 601.0169; HPLC (método A) T_r = 7.74.

9-(3-aminopropil)-8-(6-yodobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)purin-6-amina [13] (Esquema 3). A una suspensión del Compuesto **12** (34 mg, 0.0566 mmol) en MeOH/CH₂Cl₂ (0.7:0.1 mL) se agregó hidrato de hidrazina (41 μL, 42.5 mg, 0.849 mmol) y la mezcla se agitó a ta durante la noche. Se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 17 mg (64%) de **13**. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄) δ 8.22 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.05 (s, 2H), 4.31 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.76 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.05 (m, 2H); HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculado para C₁₅H₁₆IN₆O₂S, 471.0100; encontrado 471.0086; HPLC (método A) T_r = 5.78.

55 PU-H71-FITC3 [14] (Esquema de reacción 3). El compuesto **13** (8.4 mg, 0.0179 mmol), FITC (7.7 mg, 0.0196 mmol) y Et₃N (0.1 mL) en DMF (0.2 mL) se agitó durante 12 h a ta. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por HPLC para dar 11.4 mg (74%) de **14**. ¹H RMN (600 MHz, MeOH-d₄) δ 8.23 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.68 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.09 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.63-6.70 (m, 4H), 6.50 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 5.97 (s, 2H), 4.34 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.61 (m, 2H), 2.21 (t, J = 6.5 Hz, 2H); MS (ESI) m/z 860.1

$[M+H]^+$; HRMS (ESI) m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{36}H_{27}IN_7O_7S_2$, 860.0458; encontrado 860.0451; HPLC (método B) $T_r = 9.48$ (96%).

PU-H71-NBD3 [15] (Esquema 3). El compuesto **13** (7.2 mg, 0.0153 mmol), NBD-Cl (3.1 mg, 0.0213 mmol) y Et_3N (2.3 μL , 0.0168 mmol) en DMF (0.2 mL) se agitó durante 12 h a ta. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por CCD preparatoria ($CH_2Cl_2:MeOH-NH_3$ (7N), 20:1) para dar 4.1 mg (42%) de **15**. 1H RMN (600 MHz, $DMF-d_7$) δ 9.54 (br s, 1H), 8.53 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.51 (br s, 2H), 7.28 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.42 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.10 (s, 2H), 4.47 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.67 (m, 2H), 2.35 (m, 2H); HRMS (ESI) m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{21}H_{17}IN_9O_5S$, 634.0118; encontrado 634.0130; HPLC (método B) $T_r = 9.57$ (99%).

Síntesis de tetraetilen glicol-FITC (TEG-FITC). FITC (20 mg, 0.051 mmol), tetraetilen glicol (49.9 mg, 0.257 mmol) y Et_3N (0.1 mL) en DMF (0.4 mL) se agitó durante 12 h a ta. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por HPLC para dar 17.3 mg (58%) de **TEG-FITC**. 1H RMN (600 MHz, $MeOH-d_4$) δ 7.53-8.25 (m, 2H), 7.14 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.72-6.91 (m, 4H), 6.65 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.60 (br s, 2H), 3.77 (m, 2H), 3.31-3.63 (m, 12H); HRMS (ESI) m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{29}H_{30}NO_{10}S$, 584.1590; encontrado 584.1570; HPLC (método B) $T_r = 8.97$ (99%).

2-(4-(6-Amino-8-((6-yodobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)tio)-9H-purin-9-il)butil)isoindolin-1,3-diona (16a) (Esquema 4). Se disolvieron 200 mg (0.484 mmol) del Compuesto **11** en DMF (8 mL). Se agregaron 466 mg (1.43 mmol) de Cs_2CO_3 y 683 mg (2.42 mmol) de N-(4-bromobutil)ftalimida y la mezcla se sonicó durante 30 min. Se agregó 31.5 mg (0.097 mmol) de Cs_2CO_3 y la mezcla se sonicó de nuevo durante 30 min. Esto se repitió dos veces más durante un tiempo de reacción total de 2 h. Se removió DMF y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria ($CH_2Cl_2:MeOH:AcOH$, 15:1:0.5) para dar 134 mg (45%) del Compuesto **16a**. 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.18 (s, 1H), 7.84 (dd, $J = 5.5, 3.1$ Hz, 2H), 7.72 (dd, $J = 5.5, 3.1$ Hz, 2H), 7.22 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.76 (br s, 2H), 5.99 (s, 2H), 4.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.69 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.67-1.83 (m, 4H); MS (ESI) m/z 615.2 $[M+H]^+$.

9-(4-Aminobutil)-8-((6-yodobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)tio)-9H-purin-6-amina (17a) (Esquema 4). A una suspensión del Compuesto **16a** (38.9 mg, 0.063 mmol) en 2 mL de $MeOH/CH_2Cl_2$ (7:1 mL) se agregó hidrato de hidrazina (46 μL , 0.950 mmol) y la mezcla se agitó a ta durante 12 h. Se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria ($CH_2Cl_2:MeOH-NH_3$ (7N), 10:1) para dar 18 mg (59%) del Compuesto **17a**. 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3/MeOH-d_4$) δ 8.22 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.05 (s, 2H), 4.23 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.78 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.82-1.91 (m, 2H), 1.55-1.63 (m, 2H); MS (ESI) m/z 485.0 $[M+H]^+$.

PU-H71-FITC4 (18a) (Esquema 4): El compuesto **17a** (9.7 mg, 0.020 mmol), FITC (8.57 mg (0.022 mmol) y Et_3N (0.1 mL) en DMF (0.2 mL) se agitó durante 3 h a ta. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC para dar 5.2 mg (30%) del Compuesto **18a**. 1H RMN (600 MHz, $MeOH-d_4$) δ 8.22 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.61 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.06 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.58-6.67 (m, 4H), 6.48 (dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz, 2H), 5.97 (s, 2H), 4.30 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.58 (br s, 2H), 1.90-2.00 (m, 2H), 1.61-1.70 (m, 2H); HRMS (ESI) m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{37}H_{29}IN_7O_7S_2$, 874.0615; encontrado 874.0610; HPLC $T_r = 9.57$ (98%).

2-(6-(6-Amino-8-((6-yodobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)tio)-9H-purin-9-il)hexil)isoindolin-1,3-diona (16b) (Esquema 4). Se disolvieron 200 mg (0.484 mmol) del Compuesto **11** en DMF (8 mL). Se agregaron 466 mg (1.43 mmol) de Cs_2CO_3 y 751 mg (2.42 mmol) de N-(6-bromohexil)ftalimida y la mezcla se sonicó durante 2 h. Se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria ($CH_2Cl_2:MeOH:AcOH$, 15:1:0.5) para dar 100 mg (32%) del Compuesto **16b**. 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.26 (s, 1H), 7.83 (dd, $J = 5.4, 3.1$ Hz, 2H), 7.70 (dd, $J = 5.4, 3.0$ Hz, 2H), 7.26 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.36 (br s, 2H), 5.96 (s, 2H), 4.18 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.66 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.70-1.79 (m, 2H), 1.60-1.68 (m, 2H), 1.32-1.43 (m, 4H); MS (ESI) m/z 643.2 $[M+H]^+$.

9-(6-Aminohexil)-8-((6-yodobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)tio)-9H-purin-6-amina (17b) (Esquema 4). A una suspensión del Compuesto **16b** (97 mg, 0.1511 mmol) en 4 mL de $MeOH/CH_2Cl_2$ (7:1 mL) se agregó hidrato de hidrazina (110 μL , 2.27 mmol) y la mezcla se agitó a ta durante 12 h. Se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria ($CH_2Cl_2:MeOH-NH_3$ (7N), 10:1) para dar 47 mg (61%) de **17b**. 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.32 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 5.99 (s, 2H), 5.84 (br s, 2H), 4.20 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.67 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.72-1.84 (m, 2H), 1.31-1.45 (m, 6H); MS (ESI) m/z 513.0 $[M+H]^+$.

PU-H71-FITC5 (Compuesto 18b) (Esquema 4). El Compuesto **17b** (9.7 mg, 0.01894 mmol), FITC (8.11 mg, 0.0208 mmol) y Et_3N (0.1 mL) en DMF (0.2 mL) se agitó durante 3h a ta. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC para dar 8.0 mg (47%) del Compuesto **18b**. 1H RMN (600 MHz, $MeOH-d_4$) δ 8.23 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.08 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.71 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.67 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H), 6.53 (dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 2H), 5.96 (s, 2H), 4.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.50 (br s, 2H), 1.79-1.88 (m, 2H), 1.52-1.61 (m, 2H), 1.31-1.42 (m, 4H); HRMS (ESI) m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{39}H_{33}IN_7O_7S_2$, 902.0928; encontrado 902.0939; HPLC $T_r = 10.02$ (99%).

2-(8-(6-Amino-8-((6-yodobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)tio)-9H-purin-9-il)octil)isoindolin-1,3-diona (16c) (Esquema 4). Se disolvieron 200 mg (0.484 mmol) de Compuesto **11** en DMF (8 mL). Se agregaron 466 mg (1.43 mmol) de Cs_2CO_3 y 819 mg (2.42 mmol) de N-(8-bromoocitil)ftalimida y la mezcla se sonicó durante 1.5 h. Se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria ($CH_2Cl_2:MeOH:AcOH$,

15:1:0.5) para dar 120 mg (34%) de Compuesto **16c**. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (s, 1H), 7.84 (dd, $J = 5.5, 3.1$ Hz, 2H), 7.70 (dd, $J = 5.5, 3.1$ Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.29 (br s, 2H), 5.96 (s, 2H), 4.18 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.67 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.62-1.77 (m, 4H), 1.25-1.36 (m, 8H); MS (ESI) m/z 671.3 [M+H]⁺.

9-(8-Aminoocitil)-8-((6-yodobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)to)-9H-purin-6-amina (17c). A una suspensión del Compuesto **16c** (90.1 mg, 0.1345 mmol) en 4 mL de MeOH/ CH_2Cl_2 (7:1 mL) se agregó hidrato de hidrazina (98 μL , 2.017 mmol) y la mezcla se agitó a ta durante 12 h. Se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria (CH_2Cl_2 :MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 25 mg (34%) de **17c**. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8.33 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 5.99 (s, 2H), 5.72 (br s, 2H), 4.20 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.66 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.70-1.80 (m, 2H), 1.36-1.45 (m, 2H), 1.21-1.35 (m, 8H); MS (ESI) m/z 541.1 [M+H]⁺.

Síntesis de PU-H71-FITC6 (Compuesto 18c) (Esquema 4): El Compuesto **17c** (15.0 mg, 0.028 mmol), FITC (11.9 mg, 0.031 mmol) y Et₃N (0.1 mL) en DMF (0.2 mL) se agitó durante 4 h a ta. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC para dar 16.9 mg (66%) del Compuesto **18c**. ^1H RMN (600 MHz, MeOH- d_4) δ 8.22 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.68 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.09 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.67 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 6.53 (dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz, 2H), 5.96 (s, 2H), 4.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.50 (br s, 2H), 1.74-1.81 (m, 2H), 1.52-1.59 (m, 2H), 1.23-1.35 (m, 8H); HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculado para C₄₁H₃₇IN₇O₇S₂, 930.1241; encontrado 930.1231; HPLC T_r = 10.60 (96%).

Síntesis de PU-FITC7 (Compuesto 20) (Esquema 7): El Compuesto **19** (15.0 mg, 0.025 mmol), FITC (10.7 mg, 0.0275 mmol) y Et₃N (0.1 mL) en DMF (0.3 mL) se agitó durante 8 h a ta. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC para dar 23.5 mg (95%) de **PU-FITC7**. ^1H RMN (600 MHz, MeOH- d_4 , 2 rotámeros) δ 8.18-8.22 (m, 1H), 7.75-7.87 (m, 4H), 7.53-7.58 (m, 1H), 7.19-7.23 (m, 1H), 7.05 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.98 (s, 0.15H), 6.95 (s, 0.85H), 6.57-6.75 (m, 4H), 6.46-6.55 (m, 2H), 6.05 (s, 0.3H), 6.00 (s, 1.7H), 3.95-4.05 (m, 2H), 3.55-3.64 (m, 1.7H), 2.86-2.92 (m, 0.3H), 2.03-2.12 (m, 1.7H), 1.93-2.00 (m, 0.3H), 1.18 (d, $J = 6.5$ Hz, 0.9H), 1.13 (d, $J = 6.5$ Hz, 5.1H); HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculado para C₄₇H₃₆F₆N₇O₇S₂, 988.2022; encontrado 988.2005; HPLC T_r = 11.00 (99%).

Síntesis de PU-FITC8 (Compuesto 22) (Esquema 8): El Compuesto **21** (19.4 mg, 0.050 mmol), FITC (21.4 mg, 0.055 mmol) y Et₃N (0.1 mL) en DMF (0.4 mL) se agitó durante 14 h a ta. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC para dar 34.3 mg (88%) de **PU-FITC8**. ^1H RMN (600 MHz, MeOH- d_4) δ 8.35 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.69 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, 1H), 7.20 (dd, $J = 8.1, 1.9$ Hz, 1H), 7.14-7.18 (m, 2H), 6.91 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.76-6.85 (m, 4H), 6.59-6.65 (m, 2H), 6.01 (s, 2H), 4.40 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.82 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.35-2.43 (m, 2H), 1.31 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H); HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculado para C₃₉H₃₄N₇O₇S₂, 776.1961; encontrado 776.1978; HPLC T_r = 10.13 (98%).

Síntesis de PU-FITC9 (Compuesto 24) (Esquema 9): El Compuesto **23** (10.0 mg, 0.032 mmol), FITC (13.9 mg, 0.036 mmol) y Et₃N (0.1 mL) en DMF (0.3 mL) se agitaron a ta durante la noche. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC para dar 18.3 mg (82%) de **PU-FITC9**. ^1H RMN (600 MHz, MeOH- d_4) δ 8.33 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.66 (dd, $J = 8.1, 1.8$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.73-6.83 (m, 4H), 6.58-6.65 (m, 2H), 4.73-4.76 (m, 2H), 4.23 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.81-3.85 (m, 2H), 3.74-3.81 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 2.28-2.37 (m, 2H), 1.30 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H); HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculado para C₃₅H₃₆N₇O₇S, 698.2397; encontrado 698.2399; HPLC T_r = 9.20 (99%).

Síntesis de DZ13-FITC1 (Esquema 10). PU-DZ13 (20.8 mg, 0.0406 mmol), FITC (17.4 mg, 0.0447 mmol) y Et₃N (0.1 mL) en DMF (0.3 mL) se agitaron durante 12 h a ta. La mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC para dar 33.7 mg (92%) de **DZ13-FITC1**. ^1H RMN (500 MHz, DMF- d_7) δ 9.46 (s, 1H), 8.05 (dd, $J = 7.0, 1.8$ Hz, 1H), 7.76-7.82 (m, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.26 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.78 (m, 2H), 6.67-6.72 (m, 4H), 6.11 (s, 2H), 4.59 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.42 (s, 2H), 4.39 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.53 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.17-2.28 (m, 1H), 0.92 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H); HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculado para C₄₀H₃₄FIN₇O₇S, 902.1269; encontrado 902.1293; HPLC T_r = 11.77 (98%).

Síntesis de SNX-FITC (Esquema 11). El Compuesto **25** (9.5 mg, 0.0205 mmol), FITC (8.8 mg, 0.0225 mmol) y Et₃N (0.1 mL) en DMF (0.2 mL) se agitaron durante 4 h a ta. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por HPLC para dar 13.5 mg (77%) de un sólido anaranjado. RMS (ESI) m/z [M+HH]⁺ calculado para C₄₄H₄₀F₃N₆O₇S, 853.2631; encontrado 853.2630.

6.1.2. Síntesis de compuestos biotinilados

PU-H71-biotina3. 13 (9.1 mg, 0.0193 mmol), D-biotina (7.1 mg, 0.0290 mmol), DCC (8 mg, 0.0386 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP en CH_2Cl_2 (1 mL) se sonicó durante 5 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria (CH_2Cl_2 :MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 7.5 mg (56%) de **PU-H71-biotina3**. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3 /MeOH- d_4) δ 7.97 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 5.84 (s, 2H), 4.23-4.27 (m, 1H), 4.05-4.09 (m, 1H), 4.03 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.02 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.90-2.97 (m, 1H), 2.67 (dd, $J = 4.9, 12.8$ Hz, 1H), 2.49 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 2.01 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.75-1.83 (m, 2H), 1.34-1.54 (m, 4H), 1.18-1.27 (m, 2H); MS (ESI): m/z 697.1 [M+H]⁺.

PU-H71-biotina2. 2 (30 mg, 0.059 mmol), D-biotina (19 mg, 0.078 mmol), DCC (24 mg, 0.117 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP en CH_2Cl_2 (1 mL) se sonicó durante 9 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión

reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH-NH}_3$ (7N), 10:1) para dar 43.2 mg (99%) de **PU-H71-biotina2**. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3 , 2 rotámeros) δ 8.22 (s, 1H), 7.22 (s, 0.6H), 7.21 (s, 0.4H), 6.87 (s, 0.6H), 6.76 (s, 0.4H), 6.25 (br s, 0.6H), 6.16 (br s, 0.4H), 5.88-5.96 (m, 2H), 5.85 (br s, 0.6H), 5.78 (br s, 0.4H), 4.54-4.63 (m, 0.6H), 4.32-4.45 (m, 1.6H), 4.21-4.25 (m, 0.4H), 4.11-4.19 (m, 1.4H), 4.00-4.07 (m, 0.6H), 3.88-3.95 (m, 0.4H), 2.97-3.22 (m, 2.4H), 2.78-2.84 (m, 1H), 2.69-2.77 (m, 0.6H), 2.62-2.68 (m, 1H), 2.22-2.27 (m, 0.6H), 1.94-2.05 (m, 1.4H), 1.74-1.89 (m, 1.4H), 1.43-1.72 (m, 3H), 1.16-1.40 (m, 3.6H), 1.00-1.06 (m, 4H), 0.97 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H); MS (ESI): m/z 739.2 [M+H]⁺.

PU-H71-biotina4. 13 (16.9 mg, 0.0359 mmol), NHS-LC-Biotina EZ-Link[®] (17.9 mg, 0.0394 mmol) y DIEA (9.3 mg, 12.5 μL , 0.0718 mmol) en DMF (0.5 mL) se agitó a ta durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH-NH}_3$ (7N), 10:1) para dar 20.8 mg (72%) de **PU-H71-biotina4**. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8.22 (s, 1H), 7.52 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.66 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 6.25 (br s, 2H), 6.03 (s, 2H), 4.47-4.52 (m, 1H), 4.28-4.33 (m, 1H), 4.25 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.17-3.25 (m, 4H), 3.11-3.17 (m, 1H), 2.90 (dd, $J = 5.0, 12.9$ Hz, 1H), 2.63-2.79 (m, 1H), 2.24 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.13-2.19 (m, 2H), 1.94-2.02 (m, 2H), 1.58-1.74 (m, 6H), 1.48-1.56 (m, 2H), 1.31-1.46 (m, 4H); MS (ESI): m/z 810.3 [M+H]⁺.

PU-H71-biotina7. 2 (15 mg, 0.0292 mmol), NHS-LC-Biotina EZ-Link[®] (14.6 mg, 0.0321 mmol) y DIEA (7.5 mg, 10.2 μL , 0.0584 mmol) en DMF (0.5 mL) se calentó a 35°C durante 6 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH-NH}_3$ (7N), 10:1) para dar 10.3 mg (41%) de **PU-H71-biotina7**. Además, 6.9 mg de **2** no reaccionado se recuperó para dar un rendimiento concreto de 77%. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , 2 rotámeros) δ 8.26-8.29 (m, 1H), 7.29 (s, 0.4H), 7.28 (s, 0.6H), 6.87 (s, 0.4H), 6.85 (s, 0.6H), 6.76 (br s, 0.4H), 6.74 (br s, 0.6H), 6.51-6.63 (br s, 2H), 5.96-6.00 (m, 2H), 5.68 (br s, 0.4H), 5.58 (br s, 0.6H), 4.56-4.64 (m, 0.4H), 4.45-4.52 (m, 1H), 4.28-4.36 (m, 1H), 4.20-4.27 (m, 2H), 4.01-4.09 (m, 0.6H), 3.08-3.32 (m, 5H), 2.86-2.94 (m, 1H), 2.69-2.76 (m, 1H), 2.31-2.37 (m, 1H), 1.96-2.22 (m, 4H), 1.89-1.96 (m, 1H), 1.30-1.80 (m, 12H), 1.10-1.16 (m, 4H), 1.04-1.09 (m, 2H); MS (ESI): m/z 852.3 [M+H]⁺.

PU-H71-biotina5. 13 (16.6 mg, 0.0352 mmol), NHS-LC-LC-Biotina EZ-Link[®] (22.0 mg, 0.0387 mmol) y DIEA (9.1 mg, 12.3 μL , 0.0704 mmol) en DMF (0.5 mL) se agitó a ta durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH-NH}_3$ (7N), 10:1) para dar 27.8 mg (86%) de **PU-H71-biotina5**. ^1H RMN (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_4$) δ 8.12 (s, 1H), 7.60 (m, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.09 (m, 1H), 6.98 (s, 1H), 5.97 (s, 2H), 4.38-4.44 (m, 1H), 4.20-4.24 (m, 1H), 4.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.04-3.18 (m, 7H), 2.83 (dd, $J = 5.0, 12.9$ Hz, 1H), 2.64 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 2.16 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.03-2.12 (m, 4H), 1.88-1.96 (m, 2H), 1.18-1.66 (m, 18H); MS (ESI): m/z 923.4 [M+H]⁺.

PU-H71-biotina8. 2 (15 mg, 0.0292 mmol), NHS-LC-LC-Biotina EZ-Link[®] (18.2 mg, 0.0321 mmol) y DIEA (7.5 mg, 10.2 μL , 0.0584 mmol) en DMF (0.5 mL) se calentó a 35°C durante 6 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH-NH}_3$ (7N), 10:1) para dar 8.2 mg (29%) de **PU-H71-biotina8**. Además, 9.6 mg de **2** no reaccionado se recuperó para dar un rendimiento concreto de 81%. ^1H RMN (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_4$, 2 rotámeros) δ 8.18 (s, 0.4H), 8.16 (s, 0.6H), 7.31 (s, 1H), 6.98 (s, 0.6H), 6.95 (s, 0.4H), 6.80-6.90 (m, 2H), 5.98 (s, 2H), 4.47-4.55 (m, 0.4H), 4.41-4.47 (m, 1H), 4.23-4.27 (m, 1H), 4.16-4.22 (m, 2H), 3.95-4.03 (m, 0.6H), 3.31-3.34 (m, 0.6H), 3.19-3.24 (m, 1.4H), 3.07-3.17 (m, 5H), 2.82-2.89 (m, 1H), 2.64-2.70 (m, 1H), 2.25-2.32 (m, 1H), 1.94-2.16 (m, 7H), 1.18-1.70 (m, 18H), 1.09 (d, $J = 6.7$ Hz, 4H), 1.03 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H); MS (ESI): m/z 965.5 [M+H]⁺.

PU-H71-biotina6. 13 (17.6 mg, 0.0374 mmol), NHS-PEG₄-Biotina EZ-Link[®] (24.2 mg, 0.0411 mmol) y DIEA (9.7 mg, 13 μL , 0.0704 mmol) en DMF (0.5 mL) se agitó a ta durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH-NH}_3$ (7N), 10:1) para dar 31.0 mg (88%) de **PU-H71-biotina6**. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (s, 1H), 7.51 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.03 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.57 (br s, 2H), 6.01 (s, 2H), 5.97 (s, 1H), 4.48-4.53 (m, 1H), 4.25-4.35 (m, 3H), 3.79 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.59-3.68 (m, 12H), 3.57 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.40-3.46 (m, 2H), 3.18-3.24 (m, 2H), 3.12-3.18 (m, 1H), 2.90 (dd, $J = 5.0, 12.8$ Hz, 1H), 2.75 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H), 2.54 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.20 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.40-2.01 (m, 2H), 1.59-1.79 (m, 4H), 1.38-1.48 (m, 2H); MS (ESI): m/z 944.4 [M+H]⁺.

PU-H71-biotina9. 2 (15 mg, 0.0292 mmol), NHS-PEG₄-Biotina EZ-Link[®] (18.9 mg, 0.0321 mmol) y DIEA (7.5 mg, 10.2 μL , 0.0584 mmol) en DMF (0.5 mL) se calentó a 35°C durante 6 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por CCD preparatoria ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH-NH}_3$ (7N), 10:1) para dar 9.3 mg (32%) de **PU-H71-biotina9**. Además, 9.0 mg de **2** no reaccionado se recuperó para dar un rendimiento concreto de 81%. ^1H RMN (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_4$, 2 rotámeros) δ 8.18 (s, 0.4H), 8.16 (s, 0.6H), 7.30-7.32 (m, 1H), 6.98 (s, 0.6H), 6.96 (s, 0.4H), 5.98 (s, 2H), 4.49-4.56 (m, 0.4H), 4.39-4.46 (m, 1H), 4.22-4.27 (m, 1H), 4.15-4.21 (m, 2H), 3.99-4.07 (m, 0.6H), 3.66-3.71 (m, 2H), 3.51-3.61 (m, 12H), 3.45-3.50 (m, 2H), 3.29-3.38 (m, 2H), 3.16-3.25 (m, 2H), 3.07-3.12 (m, 1H), 2.81-2.88 (m, 1H), 2.63-2.68 (m, 1H), 2.57-2.63 (m, 1.2H), 2.41-2.47 (m, 0.8H), 1.98-2.18 (m, 4H), 1.52-1.70 (m, 4H), 1.32-1.41 (m, 2H), 1.08 (d, $J = 6.7$ Hz, 4H), 1.02 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H); MS (ESI): m/z 986.5 [M+H]⁺.

PU-H71-biotina. 6 (4.2 mg, 0.0086 mmol) y Amina-PEO₃-Biotina EZ-Link[®] (5.4 mg, 0.0129 mmol) en DMF (0.2 mL) se agitó a ta durante 24 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se procesó por cromatografía ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH-NH}_3$ (7N), 5:1) para dar 1.1 mg (16%) de **PU-H71-biotina**. ^1H RMN (CDCl_3) δ 8.30 (s, 1H), 8.10 (s,

1H), 7.31 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.73 (br s, 1H), 6.36 (br s, 1H), 6.16 (br s, 2H), 6.00 (s, 2H), 4.52 (m, 1H), 4.28-4.37 (m, 3H), 3.58-3.77 (m, 10H), 3.55 (m, 2H), 3.43 (m, 2H), 3.16 (m, 1H), 2.92 (m, 1H), 2.80 (m, 2H), 2.72 (m, 1H), 2.66 (m, 2H), 2.17 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.04 (m, 2H), 1.35-1.80 (m, 6H); MS (ESI): m/z 872.2 [M+H]⁺.

6.1.3. Síntesis de compuestos etiquetados con ANCA

Síntesis de N-(3-(6-Amino-8-((6-yodobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)thio)-9H-purin-9-il)propil)-2-cianoacetamida (Compuesto 26) (Esquema 17). Al Compuesto 13[†] (120.3 mg, 0.256 mmol) en CH₂Cl₂ (4 mL) se agregó ácido cianoacético (26 mg, 0.307 mmol) y DCC (63 mg, 0.307 mmol) y agitó a ta durante 5 h. La mezcla de reacción se concentró y purificó por cromatografía (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 100:1 hasta 50:1) para dar 131 mg (95%) del Compuesto 26. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 8.25 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.07 (s, 2H), 4.27 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.27 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 1.98-2.06 (m, 2H); MS (m/z): [M+H]⁺ 538.0.

Síntesis de PU-ANCA (Compuesto 28 (Esquema 17). Al Compuesto 326 (44 mg, 0.0825 mmol) en DMF (1 mL) se agregó 27 (19 mg, 0.075 mmol) y piperidina (10 μ L) y calentó a 70°C durante 24 h. La mezcla de reacción se concentró y purificó por CCD preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 12.5:1) para dar 24.3 mg (42%) del Compuesto 28 como un sólido anaranjado. ¹H RMN (600 MHz, DMF-d₇): δ 8.73 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 8.38 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.18 (dd, J = 8.8, 1.7 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.56 (dd, J = 9.2, 2.5 Hz, 1H), 7.52 (br s, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.34 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.16 (s, 2H), 4.40 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.44-3.47 (m, 4H), 3.38-3.43 (m, 2H), 2.53-2.58 (m, 4H), 2.30 (s, 3H), 2.09-2.15 (m, 2H); ¹³C RMN (150 MHz, DMF-d₇): δ 161.5, 156.0, 153.5, 151.7, 151.5, 151.2, 149.5, 148.8, 144.4, 137.2, 133.6, 130.3, 129.2, 127.4, 127.0, 126.5, 125.2, 120.1, 119.3, 118.9, 117.4, 111.0, 108.5, 103.0, 102.9, 89.4, 54.9, 47.9, 45.6, 41.3, 40.5, 37.2; HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ calculado para C₃₄H₃₃N₉O₃S, 774.1472; encontrado 774.1473.

6.1.4. Síntesis de Compuestos Radioetiquetados

Los compuestos precursores de PU-H71, PU-HZ151 y PU-DZ13 se sintetizaron como adecuados para radioiodación (esto es precursores Sn). Para radioiodación, la síntesis sigue la reacción mostrada en el Esquema 19. Brevemente, los compuestos PU se solvataron en metanol (25 μ g de PU-H71 y PU-HZ151; 15 μ g de PU-DZ13), y agregaron a NaI (5-10 μ L) ([¹²⁴I] isotopo para formación de imágenes, [¹³¹I] para biodistribución), seguido por oxidación con Cloramina T (CT, 10 μ L, 10 min) en medio ácido (2 mg/mL en ácido acético). Los compuestos calientes (radioetiquetados) se sintetizaron con el grupo protector amina BOC (*tert*-Butiloxicarbonilo), que se removió bajo condiciones ácidas (por ejemplo ácido trifluoroacético (TFA), HCl de ácido clorhídrico)) para cada compuesto y purificado usando cromatografía líquida de presión alta (HPLC). Los precursores PU-DZ13 y PU-HZ151 se radioetiquetaron usando 15 μ L de metanol (MeOH) para el solvato, 10 min de incubación a temperatura ambiente (TA) en CT después de la adición de la radioetiqueta, que se siguió por la adición de 50 μ L de TFA, y una h de incubación a 70°C. El precursor PU-H71 se radioetiquetó con 20 μ L de MeOH y 15 μ L de CT directamente después de la adición de la radioetiqueta, después de cuyo tiempo la solución se calentó a 50°C durante 5 min, y luego se permitió enfriar durante 2 min. Después, 10 μ L de éster de metil de metionina (formulado de 0.5 g/mL en H₂O) y 10 μ L de HCl concentrado se agregaron antes de la incubación a 50°C (1 h). Los productos radioetiquetados se recolectaron y los solventes se removieron bajo presión reducida, usando un evaporador rotatorio. La actividad específica de [¹²⁴I]-PU-H71 fue ~1000 mCi/ μ mol, que estuvo en línea con las experiencias previas de los inventores con esta clase de compuesto [¹²⁴I]. Para la administración *in vivo*, los compuestos [¹²⁴I]-PU se formularon en solución salina al 0.9% estéril.

6.2. Evaluación de la función de la HSP90 en Células Cancerosas

Los métodos descritos en esta sección se relacionan con la descripción en la Sección 5.1.

Línea de células y Células Primarias: Las líneas de células CML K562, Kasumi-4, MEG-01 y KU182, la línea de células cancerosas de mama triple negativo MDA-MB-468, las líneas de células cancerosas de mama SKBr3 HER2+, la línea de células de melanoma SK-Mel-28, las líneas de células cancerosas de próstata LNCaP y DU145, la línea de células cancerosas pancreático Mia-PaCa-2, fibroblasto de colon, línea de células CCCD18Co se obtuvieron de la Recolección de Cultivos de Tipo Americano. La línea de células CML KCL-22 se obtuvo de la Recolección Japonesa de Biorrecursos de Investigación. Las células de fibroblastos NIH-3T3 se transfecaron como se describe previamente⁶⁵. Las células se cultivaron en DMEM/F12 (MDA-MB-468, SKBr3 y Mia-PaCa-2), RPMI (K562, SK-Mel-28, LNCaP, DU145 y NIH-3T3) o MEM (CCCD18Co) complementado con 10% de FBS, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina y estreptomicina. Las células Kasumi-4 se mantuvieron en IMDM complementado con 20% de FBS, 10 ng/ml de factor estimulador de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) y 1×Pen/Strep. Sangre de PBL (leucocitos de sangre periférica humana) (n=3) y de cordón umbilical (n=5) se obtuvieron de sangre de pacientes adquirida del New York Blood Center. Treinta y cinco ml de la suspensión de células se colocó sobre 15 ml de Ficoll-Paque plus (GE Healthcare). Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 40 minutos a 4°C, y se recolectó la interfaz de leucocitos. Las células se colocaron en placas en un medio RPMI con 10% de FBS y se usaron como se indica. Las células de CML y AML humano primario crónico y de crisis de blastocitos se obtuvieron con consentimiento informado. La manipulación y análisis de las muestras se aprobó por la Universidad de Rochester, Weill Cornell Medical College and University of Pennsylvania Institutional Review Boards. Las células mononucleares se aislaron usando la separación en gradiente de densidad Ficoll-Plaque (Pharmacia Biotech,

Piscataway, NJ). Las células se crioconservaron en un medio de congelación que consiste en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), 40% de suero bovino fetal (FBS), y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) o en CryoStor^{MR} CS-10 (Biolife). Cuando se cultivaron, las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ a 37°C.

5 **Lisis de células para la precipitación química e inmunoprecipitación:** Las células se lisaron al recolectarlas en solución amortiguadora Feltz (HEPES 20mM, KCl 50mM, MgCl₂ 5mM, NP40 0.01%, Na₂MoO₄ recientemente preparado 20mM, pH 7.2-7.3) con 1µg/µL agregado de inhibidores de proteasa (leupeptina y aprotinina), seguido por tres etapas de congelación y descongelación sucesivas (en hielo seco). La concentración de proteínas totales se determinó usando el kit BCA (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 **Inmunoprecipitación:** El anticuerpo Hsp90 (H9010) o IgG normal (Santa Cruz Biotechnology) se agregó en un volumen de 10 µL a la cantidad indicada de lisado celular junto con 40 µL de perlas de agarosa de proteína G (Upstate), y la mezcla se incubó a 4°C durante la noche. Las perlas se lavaron cinco veces con solución amortiguadora de lisis Feltz y se separaron por SDS-PAGE, seguido por un procedimiento de western blot estándar.

15 **Precipitación química:** Las perlas de inhibidores de HSP90 o perlas de control, que contienen un químico inactivo a HSP90 (etanolamina) conjugadas a perlas de agarosa, se lavaron tres veces en solución amortiguadora de lisis. A menos que se indique de otra manera, los conjugados de perlas (80µL) luego se incubaron a 4°C con las cantidades indicadas de lisados celulares (120-500 µg), y el volumen se ajustó a 200 µL con solución amortiguadora de lisis. Después de la incubación, los conjugados de perlas se lavaron 5 veces con la solución amortiguadora de lisis y las proteínas retenidas en el soporte se analizaron por Western blot. Para los estudios de agotamiento, se llevaron a cabo 2-4 precipitaciones químicas sucesivas, seguido por las etapas de inmunoprecipitación, donde se indicó.

Reactivos: Los inhibidores de HSP90, los derivados inmovilizados sobre un soporte sólido y etiquetados con fluoresceína se sintetizaron como se reportó previamente⁷⁵⁻⁷⁷. Los inventores adquirieron Gleevec de LC Laboratories, AS703026 de Selleck, KN-93 de Tocris, y PP242, BMS-345541 y vanadato de sodio de Sigma. Todos los compuestos se usaron como soluciones madre de DMSO.

25 **Análisis de Western Blot:** Las células se trataron ya sea con PU-H71 o DMSO (vehículo) durante 24 h y se lisaron en Tris 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM y 1% de solución amortiguadora de lisis NP40 complementada con leupeptina (Sigma Aldrich) y aprotinina (Sigma Aldrich). Las concentraciones de proteína se determinaron usando el kit BCA (Pierce) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los lisados de proteínas (15-200 µg) se resolvieron electroforéticamente por SDS/PAGE, se transfecaron a la membrana de nitrocelulosa y se sondearon con los siguientes anticuerpos primarios contra: HSP90 (1:2000, SMC-107A/B; StressMarq), Bcr-Abl (1:75, 554148; BD Pharmingen), PI3K (1:1000, 06-195; Upstate), mTOR (1:200, Sc-1549; Santa Cruz), p-mTOR (1:1000, 2971; Cell Signaling), STAT3 (1:1000, 9132; Cell Signaling), p-STAT3 (1:2000, 9145; Cell Signaling), STAT5 (1:500, Sc-835; Santa Cruz), p-STAT5 (1:1000, 9351; Cell Signaling), RICTOR (1:2000, NB100-611; Novus Biologicals), RAPTOR (1:1000, 2280; Cell Signaling), P90RSK (1:1000, 9347; Cell Signaling), Raf-1 (1:300, Sc-133; Santa Cruz), CARM1 (1:1000, 09-818; Millipore), CRKL (1:200, Sc-319; Santa Cruz), GRB2 (1:1000, 3972; Cell Signaling), FAK (1:1000, Sc-1688; Santa Cruz), BTK (1:1000, 3533; Cell Signaling), A-Raf (1:1000, 4432; Cell Signaling), PRKD2 (1:200, sc-100415, Santa Cruz), HCK (1:500, 06-833; Millipore), p-HCK (1:500, ab52203; Abcam) y β-actina (1:2000, A1978; Sigma). Las membranas luego se incubaron con una dilución de 1:3000 de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante correspondiente. La detección se llevó a cabo usando el Sistema de Detección de Quimioluminiscencia Mejorado con ECL (Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Densitometría: Los geles se escanearon en Adobe Photoshop 7.0.1 y se llevó a cabo el análisis densitométrico cuantitativo usando el software Un-Scan-It 5.1 (Silk Scientific).

45 **Estudios de ligación de radioisótopos y estudios de cuantificación de HSP90:** Los estudios de saturación se llevaron a cabo con ¹³¹I-PU-H71 y células (K562, MDA-MB-468, SKBr3, LNCaP, DU-145, MRC-5 y PBL). Brevemente, las muestras por triplicado de células se mezclaron con una cantidad cada vez mayor de ¹³¹I-PU-H71 ya sea con o sin 1 µM de PU-H71 no etiquetado. Las soluciones se agitaron en un agitador orbital y después de 1 hr las células se aislaron y se lavaron con solución salina amortiguada con Tris enfriada con hielo usando un recolector de células Brandel. Todas las muestras celulares aisladas se contaron y la captación específica de ¹³¹I-PU-H71 se determinó. Estos datos se graficaron contra la concentración de ¹³¹I-PU-H71 para proporcionar una curva de ligación de saturación. Para la cuantificación de HSP90 ligada a PU, 9.2x10⁷ de células K562, 6.55x10⁷ de células KCL-22, 2.55x10⁷ de células KU182 y 7.8x10⁷ de células MEG-01 se lisaron para dar por resultado 6382, 3225, 1349 y 3414 µg de proteína total, respectivamente. Para calcular el porcentaje de HSP90, la expresión de HSP90 celular se cuantificó al usar las curvas estándares creadas de HSP90 recombinante purificada de células HeLa (Stressgen#ADI-SPP-770).

55 **Pulso-Caza.** Las células K562 se trataron con Na₃VO₄ (1 mM) con o sin PU-H71 (5 µM), como se indica. Las células se recolectaron en los tiempos indicados y se lisaron en Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y 1% de solución amortiguadora de lisis NP-40, y luego se sometieron a procedimiento de western blot.

Digestión tríptica: Las células K562 se trataron durante 30 minutos con vehículo o PU-H71 (50 µM). Las células se

recolectaron y se lisaron en Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, 1% de solución amortiguadora de lisis NP-40. La proteína STAT5 se inmunoprecipitó de 500 µg de lisado de proteínas totales con un anticuerpo anti-STAT5 (Santa Cruz, sc-835). Los precipitados de proteínas ligadas a las perlas de agarosa de proteína G se lavaron con la solución amortiguadora de tripsina (Tris 50 mM pH 8.0, CaCl₂ 20 mM) y 33 ng de tripsina se habían agregado a cada muestra.

5 Las muestras se incubaron a 37°C y las alícuotas se recolectaron en los puntos de tiempo indicados. Las alícuotas de proteína se sometieron a SDS-PAGE y se tiñeron para STAT5.

Ensayo de ligación a DNA de STAT5 activado: La capacidad de ligación de DNA de STAT5a y STAT5b se sometió a ensayo por un ensayo basado en ELISA (TransAM, Active Motif, Carlsbad, CA) después de las instrucciones del fabricante. Brevemente, 5x10⁶ de células K562 se trataron con PU-H71 1 y 10 µM o control durante 10 24 h. Diez microgramos de lisados celulares se agregaron a los pocillos que contienen oligonucleótidos consenso STAT preadsorbidos (5'-TTCCCGGAA-3'). Para las células tratadas con control el ensayo se llevó a cabo en ausencia o presencia de 20 pmol de oligonucleótidos competidores que contienen ya sea un sitio de ligación consenso STAT de tipo natural o mutado. Células HeLa tratadas con interferón (5 µg por pocillo) se usaron como controles positivos para el ensayo. Después de la incubación y lavado, los anticuerpos anti-STAT5a o anti-STAT5b 15 polyclonales de conejo (1:1000, Porción Activa) se agregaron a cada pocillo, seguido por el anticuerpo secundario anticoncejo HPR (1:1000, Porción Activa). Después de la adición del substrato de HRP, la absorbancia se leyó a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 655 nm (Synergy4, Bioteck, Winooski, VT). En este ensayo la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad del factor de transcripción ligado a DNA presente en la muestra. Los experimentos se llevaron a cabo en cuatro replicados. Los resultados se expresaron como unidades 20 arbitrarias (AU) de los valores de absorbancia media con SEM.

Inmunoprecipitación de Cromatina Cuantitativa (Q-ChIP): La Q-ChIP se realizó como se describe previamente con modificaciones⁸³. Brevemente, 10⁸ células K562 se fijaron con 1% de formaldehido, se lisaron y se hicieron pasar por ondas sonoras (Branson sonicator, Branson). Los anticuerpos STAT5 N20 (Santa Cruz) y HSP90 (Zymed) se agregaron a la muestra prelimpia y se incubaron durante la noche a 4°C. Después, se agregaron perlas de 25 proteína A o G, y la muestra se eluyó de las perlas seguido por desreticulación. El DNA se purificó usando columnas de purificación de PCR (Qiagen). La cuantificación de los productos ChIP se llevó a cabo por PCR cuantitativa (Applied Biosystems 7900HT) usando el Fast SYBR Green (Applied Biosystems). Los genes objetivos que contienen el sitio de ligación a STAT se detectaron con los siguientes cebadores: CCND2 (5-GTTGTTCTGGTCCCTTAATCG y 5-ACCTCGCATACCCAGAGA), MYC (5-ATGCGTTGCTGGGTTATTT y 5-CAGAGCGTGGGATGTTAGTG) y para 30 la región de control intergénica (5-CCACCTGAGTCTGCAATGAG y 5-CAGTCTCCAGCCTTGTCC).

QPCR en tiempo real: El RNA se extrajo de células K562 tratadas con PU-H71 y de control usando el kit RNeasy Plus (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se sintetizó usando el kit de RNA a cDNA de Alta Capacidad (Applied Biosystems). Los inventores amplificaron los genes específicos con los siguientes cebadores: MYC (5-AGAACAGACATCTCCGCATC y 5-CCTTAAACAGTGCCAACGC), CCND2 (5-TGAGCTGCTGGCTAACATCA y 5-ACGGTACTGCTGCAGGCTAT), BCL-XL (5-35 CTTTGTGAACTCTATGGGAACA y 5-CAGCGGTTGAAGCGTTCT), MCL1 (5-AGACCTTACGACGGGTTGG y 5-ACATTCCCTGATGCCACCTTC), CCND1 (5-CCTGCTACTACCGCCTCA y 5-GGCTTCGATCTGCTCCTG), HPRT (5- CGTCTTGCTCGAGATGTGATG y 5-GCACACAGAGGGCTACAATGTG), GAPDH (5-CGACCACTTGTCAAGCTCA y 5-CCCTGTTGCTGTAGCAAAT), RPL13A (5- TGAGTCAAAGGGAGCCAGAAG y 40 5-CAGATGCCCACTCACAAGA). La abundancia de transcripto se detectó usando las condiciones Fast SYBR Green (etapa inicial de 20 segundos a 95°C seguido por 40 ciclos de 1 segundo a 95°C y 20 segundos a 60°C). El valor C_T del gen de mantenimiento (RPL13A) se sustrajo de los genes correspondientes de interés (ΔC_T). La desviación estándar de la diferencia se calculó de la desviación estándar de los valores C_T (replicados). Después, 45 los valores ΔC_T de las células tratadas con PU-H71 se expresaron en relación con sus células tratadas con control respectivas usando el método $\Delta\Delta C_T$. La expresión de plegamiento para cada gen en las células tratadas con el fármaco en relación con las células tratadas con control se determina por la expresión: 2 ^{$\Delta\Delta C_T$} . Los resultados se representaron como expresión de plegamiento con el error estándar de la media para replicados.

Silenciamiento génico de la HSP70. Las transfecciones se llevaron a cabo por electroporación (Amaxa) y la Solución Nucleofectora V (Amaxa), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los estudios de silenciamiento 50 de la HSP70 se llevaron a cabo usando siRNAs designados como previamente reportados⁸⁴ contra el marco de lectura abierto de HSP70 (HSPA1A; número de acceso NM_005345). Las células de control negativo se transfecaron con la secuencia de siRNA de control invertido (HSP70C; Dharmacon RNA technologies). Las secuencias activas contra HSP70 usadas para el estudio son HSP70A (5'-GGACGAGUUUGAGCACAAG-3') y 55 HSP70B (5'-CCAAGCAGACGCAGAUUUU-3'). La secuencia para el control es HSP70C (5'-GGACGAGUUGUAGCACAAG-3'). Tres millones de células en 2 mL de medio (RPMI complementado con 1% de L-glutamina, 1% de penicilina y estreptomicina) se transfecaron con 0.5 µM de siRNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células transfecadas se mantuvieron en placas de 6 pocillos y a 84h, se lisaron seguido por los procedimientos de Western blot estándares.

Clasificación de la cinasa⁸⁵ (Figura 44). Para la mayoría de ensayos, las cepas de fago T7 etiquetadas con cinasa 60 se desarrollaron en paralelo en bloques de 24 pocillos en un hospedero de *E. coli* derivado de la cepa BL21. El *E.coli* se desarrolló a fase logarítmica y se infectó con fago T7 de una solución madre congelada (multiplicidad de infección

= 0.4) y se incubó con agitación a 32°C hasta la lisis (90-150 min). Los lisados se centrifugaron (6000 x g) y se filtraron (0.2μm) para remover los restos celulares. Las cinasas restantes se produjeron en células HEK-293 y se etiquetaron subsecuentemente con DNA para la detección por qPCR. Las perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina se trataron con ligandos de molécula pequeña biotinilados durante 30 minutos a temperatura ambiente para generar resinas de afinidad para los ensayos de cinasa. Las perlas de ligandos se bloquearon con biotina en exceso y se lavaron con solución amortiguadora de bloqueo (SeaBlock (Pierce), 1% de BSA, 0.05% de Tween 20, DTT 1 mM) para remover el ligando no enlazado y para reducir la ligación de fago no específica. Las reacciones de ligación se ensamblaron al combinar las cinasas, las perlas de afinidad de ligando, y los compuestos de prueba en 1x de solución amortiguadora de ligación (20% de SeaBlock, 0.17x de PBS, 0.05% de Tween 20, DTT 6 mM). Los compuestos de prueba se prepararon como 40x de soluciones madre en 100% de DMSO y se diluyeron directamente en el ensayo. Todas las reacciones se llevaron a cabo en placas de 384 pocillos de polipropileno en un volumen final de 0.04 ml. Las placas de ensayo se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora y las perlas de afinidad se lavaron con solución amortiguadora de lavado (1x de PBS, 0.05% de Tween 20). Las perlas luego se volvieron a suspender en solución amortiguadora de elución (1x de PBS, 0.05% de Tween 20, 0.5 μm de ligando de afinidad no biotinilado) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos. La concentración de cinasa en los eluidos se midió por qPCR. El registro de selectividad de la exploración KINOME (S) es una medición cuantitativa de la selectividad del compuesto. Se calcula al dividir el número de cinasas que se ligan al compuesto por el número total de cinasas distintas sometidas a prueba, excluyendo las variantes mutantes. TREEspot^{MR} es una herramienta de software de visualización de datos patentada desarrollada por KINOMEscan⁸⁵.

Las cinasas encontradas para ligación se marcaron con círculos en la **Figura 44**, donde los círculos más grandes indican la ligación de afinidad más alta. El dendograma de la cinasa se adaptó y se reproduce con el permiso de Science and Cell Signaling Technology, Inc.

Vectores lentivirales, producción lentiviral y transducción de células K562. Los constructos lentivirales de el silenciamiento génico de shRNA de CARM1 se adquirieron de bibliotecas de shRNA TRC lentiviral de Openbiosystem: pLKO.1-shCARM1-KD1 (catálogo No: RHS3979-9576107) y pLKO.1-shCARM1-KD2 (catalogo No: RHS3979-9576108). El shRNA de control (codificación de shRNA) fue el plásmido Addgene 1864. El GFP se clonó para reemplazar la puromicina como el marcador de selección. Los lentivirus se produjeron por transfección transiente de 293T como en el protocolo descrito previamente⁸⁶. Se recolectó el sobrenadante viral, se filtró a través de un filtro de 0.45-μm y se concentró. Las células K562 se infectaron con suspensiones concentradas lentivirales de título alto, en la presencia de 8 μg/ml de polibreno (Aldrich). Las células K562 transducidas se clasificaron para fluorescencia verde (GFP) después de 72 horas de transfección.

Extracción de RNA y PCR en Tiempo Real cuantitativa (qRT-PCR). Para la qRT-PCR, el RNA total se aisló de 10^6 células usando el mini kit RNeasy (QIAGEN, Alemania), y luego se sometió a transcripción inversa con hexámeros aleatorios (SuperScript III kit, Invitrogen). Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo usando un sistema de detección de secuencia ABI 7500. Los productos de PCR se detectaron usando ya sea la química de verde I Sybr o metodología TaqMan (PE Applied Biosystems, Norwalk, CT). Los detalles para los ensayos de PCR en tiempo real se describieron en otra parte⁸⁷. Las secuencias cebadoras para CARM1 qPCR son TGATGGCCAAGTCTGTCAAG(delantero) y TGAAAGCAACGTCAAACCAG(inverso).

Ensayo de viabilidad celular, Apoptosis, y Proliferación. La evaluación de la viabilidad en las células K562 no transfectadas o transfectadas con CARM1 shRNA o codificación se llevó a cabo usando Azul Tripán. Este cromóforo se carga negativamente y no interactúa con la célula a menos que la membrana se dañe. Por lo tanto, todas las células que excluyen el tinte son disponibles. El análisis de apoptosis se evaluó usando la microscopía de fluorescencia al mezclar dos 2 μL de anaranjado acridina (100 μg/mL), 2 μL de bromuro de etidio (100 μg/mL), y 20 μL de la suspensión celular. Un mínimo de 200 células se contó en por lo menos cinco campos aleatorios. Las células apoptóticas vivas se diferenciaron de las células apoptóticas, necróticas y normales muertas al examinar los cambios en la morfología celular sobre la base de la fluorescencia nuclear y citoplasmática distintiva. Las células viables muestran una membrana plasmática intacta (color verde), mientras que las células muertas muestran una membrana plasmática dañada (color anaranjado). Una apariencia de los cambios ultra-estructurales, incluyendo encogimiento, condensación de heterocromatina, y desgranulación nuclear, son más consistentes con la apoptosis y la membrana citoplasmática alterada con necrosis. El porcentaje de las células apoptóticas (índice apoptótico) se calculó como: % de células apoptóticas = (número total de células con núcleos apoptóticos/número total de células contadas) x 100. Para el ensayo de proliferación, 5×10^3 células K562 se colocaron en placas sobre una placa negra sólida de 96 pocillos (Corning). El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con las indicaciones del fabricante (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega). Todos los experimentos se repitieron tres veces. Donde se indicó, los estudios de inhibición de crecimiento se llevaron a cabo usando el ensayo de azul Alamar. Este reactivo ofrece una medición objetiva rápida de la viabilidad celular en el cultivo celular, y usa el tinte indicador resazurina para medir la capacidad metabólica de las células, un indicador de la viabilidad celular. Brevemente, las células exponencialmente en desarrollo se colocaron en placas, en placas de microtitulación (Corning # 3603) y se incubaron los tiempos indicados a 37°C. Los fármacos se agregaron por triplicado en las concentraciones indicadas, y la placa se incubó durante 72 horas. Se agregó resazurina (55 μM), y la placa se leyó 6 horas después de usar el Analyst GT (Modo de intensidad de fluorescencia, excitación 530nm, emisión 580nm, con espejo dicroico 560nm). Los resultados se analizaron usando los softwares Softmax Pro y the GraphPad Prism. El porcentaje de la inhibición del crecimiento celular se calculó al comparar las lecturas de fluorescencia obtenidas de las células tratadas contra

las de control. La IC₅₀ se calculó como la concentración de fármacos que inhibe el crecimiento celular un 50%.

Análisis cuantitativo de la sinergia entre los inhibidores de mTOR y HSP90: para determinar la interacción del fármaco entre pp242 (inhibidor mTOR) y PU-H71 (Inhibidor de HSP90), el método de isobolograma de índice de combinación (CI) de Chou-Talalay se usó como se describe previamente^{88,89}. Este método, basado en el principio de efecto medio de la ley de acción de masas, cuantifica el sinergismo o antagonismo para dos o más combinaciones de fármacos, sin considerar los mecanismos de cada fármaco, por simulación computarizada. Basado en los algoritmos, el software de computadora muestra gráficas de efecto medio, gráficas de índice de combinación e isobologramas normalizados (donde no se usan combinaciones de relaciones constantes de dos fármacos). El PU-H71 (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.0125 µM) y pp242 (0.5, 0.125, 0.03125, 0.0008, 0.002, 0.001 µM) se usaron como agentes individuales de las concentraciones mencionadas o combinadas en una relación no constante (PU-H71: pp242; 1:1, 1:2, 1:4, 1:7.8, 1:15.6, 1:12.5). La Fa (fracción de células exterminadas) se calculó usando las fórmulas Fa=1-Fu; la Fu es la fracción de las células no afectadas y se usó para un análisis de efecto de dosis usando el software de computadora (CompuSyn, Paramus, New Jersey, USA).

6.3. Sondas fluorescentemente etiquetadas en ensayos celulares

6.3.1. Análisis de citometría de flujo de la ligación de PU-H71 fluorescente

Líneas de células de leucemia mielógena aguda humana (AML) MOLM-13 y células MV4-11 fueron un regalo del Dr. Stephen D. Nimer, MSKCC, y se mantuvieron en un medio RPMI1640 complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) y 1×Pen/Strep en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37°C. Las células se colocaron en placas de 6 pocillos en la densidad de 5×10^5 células/mL, y se trataron con los derivados indicativos (1 µM) a 37 °C durante 4 horas. Para la detección de la ligación de HSP90 en las células vivas, las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora FACS (PBS, 0.05% de FBS), y antes del análisis, se tiñeron con 1µg/ml de DAPI (Invitrogen) en solución amortiguadora FACS a temperatura ambiente. Las intensidades de fluorescencia de las células vivas (DAPI negativos) que representa la ligación derivada fluorescente PU-H71 se capturaron por la citometría de flujo (LSR-II, BD Biosciences), y se analizaron por el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). Para la evaluación de la ligación de HSP90 en las células fijas, las células se lavaron, se fijaron durante 30 min con solución amortiguadora BD Cytofix (BD, Biosciences, San José, CA), y luego se permeabilizaron durante 30 min sobre hielo usando solución amortiguadora BD Perm III (BD Biosciences, San José, CA). La permeabilización completa de las células se determinó con el DAPI. Las células se analizaron por citometría de flujo como se menciona en lo anterior. Para las pruebas de competición, las muestras de AML primarias en la densidad de 2×10^6 células/ml se trataron con 1 µM de PU-H71 no conjugado durante 4 horas seguido por el tratamiento de 1 µM de PU-H71-FITC2 durante 1 hora. Las células se recolectaron, se lavaron dos veces, se tiñeron para CD45 para distinguir los blastocitos de los linfocitos normales e incubados durante 30 min a 4°C, se lavaron y se tiñeron con 7-AAD en solución amortiguadora FACS para ser analizados por la citometría de flujo.

6.3.2. Citometría de flujo. Aislamiento de CD34

El aislamiento de células CD34+ se llevó a cabo usando el kit MicroBead CD34 y el autoMACS clasificador de células magnético automatizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). *Ensayo de Viabilidad* – líneas de células CML se colocaron en placas de 48 pocillos en la densidad de 5×10^5 células/ml, y se trataron con dosis indicadas de PU-H71. Las células se recolectaron cada 24 horas, se tiñeron con Anexina V-V450 (BD Biosciences) y 7-AAD (Invitrogen) en solución amortiguadora de Anexina V (HEPES 10mM/NaOH, NaCl 0.14, CaCl₂ 2.5 mM). La viabilidad celular se analizó por citometría de flujo (BD Biosciences). Para las muestras de pacientes, células CML de crisis de blastocitos primaria se colocaron en placas de 48 pocillos a 2×10^6 células/ml, y se trataron con dosis indicadas de PU-H71 por hasta 96 horas. Las células se tiñeron con anticuerpos CD34-APC, CD38-PE-CY7 y CD45-APC-H7 (BD Biosciences) en solución amortiguadora FACS (PBS, 0.05% de FBS) a 4°C durante 30 minutos antes de la tinción con Anexina V/7-AAD. *Ensayo de ligación de PU-H71* – líneas de células CML se colocaron en placas de 48 pocillos en la densidad de 5×10^5 células/ml, y se trataron con 1 µM de PU-H71-FITC. A 4 horas postratamiento las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora FACS. Para medir la ligación de PU-H71-FITC en células vivas, las células se tiñeron con 7-AAD con solución amortiguadora FACS a temperatura ambiente durante 10 min, y se analizaron por citometría de flujo (BD Biosciences). A las 48 horas, y 96 horas postratamiento de PU-H71-FITC, las células se tiñeron con Anexina V-V450 (BD Biosciences) y 7-AAD en solución amortiguadora de Anexina V, y se sometieron a citometría de flujo para medir la viabilidad determinada por las acumulaciones negativas dobles de Anexina V/7AAD. Para evaluar la ligación de PU-H71-FITC a las muestras de pacientes con leucemia, células bp o cpCML primarias se colocaron en placas de 48 pocillos a 2×10^6 células/ml, y se trataron con 1 µM PU-H71-FITC. A las 24 horas postratamiento, las células se lavaron dos veces y se tiñeron con anticuerpos CD34-APC (o CD34-PECy7), CD38-PE-CY7 (o CD38-PE) y CD45-APC-H7 en solución amortiguadora FACS a 4°C durante 30 min antes de la tinción con 7-AAD. A las 48 horas, y 96 horas después del tratamiento, las células se tiñeron con anticuerpos CD34-APC (o CD34-PECy7), CD38-PE-CY7 (o CD38-PE) y CD45-APC-H7 seguido por la tinción con Anexina V-V450 y 7-AAD para medir la viabilidad celular en los blastocitos, los linfocitos y las poblaciones de células CD34+. Para la prueba de competición, líneas de células CML en la densidad de 5×10^5 células/ml o muestras de CML primarias en la densidad de 2×10^6 células/ml se trataron con 1 µM de PU-H71 no conjugados durante 4 h seguido por el tratamiento de 1 µM PU-H71-FITC durante 1 h. Las células se recolectaron, se lavaron dos veces, se tiñeron para 7-AAD en solución amortiguadora FACS, y se

analizaron por citometría de flujo. **Tinción de HSP90** – Las células se dejaron con solución amortiguadora de fijación (BD Biosciences) a 4°C durante 30 min, y se permeabilizaron en Solución Amortiguadora Perm III (BD Biosciences) sobre hielo durante 30 min. Las células se tiñeron con conjugado de ficoeritrina anti-HSP90 (PE) (clon F-8, Santa Cruz Biotechnologies; CA) durante 60 minutos. Las células se lavaron y luego se analizaron por citometría de flujo.

5 Se usó IgG2a-PE de ratón normal como control de isotipo.

6.3.3. Análisis de microscopía fluorescente de la ligación de PU-H71-FITC2 (9)

Las células MV4-11 se colocaron en placas de 48 pocillos en la densidad de 5×10^5 células/ml, y se trataron con 1 μM de PU-H71-FITC2 o PU-H71-NBD1. A las 24 horas después del tratamiento, las células se bloquearon con 3% de solución amortiguadora BSA/FACS a temperatura ambiente durante 30 min y se incubaron con anticuerpo Na⁺/K⁺-ATPase α 1 (Novus Biologicals) 3% de solución amortiguadora de BSA/FACS a temperatura ambiente durante 30 min. Las células se lavaron tres veces con solución amortiguadora FACS y se incubaron con Alexa Fluor 568 anti-conejo de cabra (Invitrogen) en 3% de solución amortiguadora BSA/FACS a temperatura ambiente durante 20 min. Las células luego se lavaron tres veces con solución amortiguadora FACS, se incubaron con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DAPI en solución amortiguadora FACS durante 10 min, se montaron sobre portaobjetos, y se observaron bajo un microscopio confocal (Zeiss).

Análisis de Western Blotting: Las células se trataron ya sea con los derivados de PU-H71 fluorescente, TEG-FITC o DMSO (vehículo) durante 24 horas y se lisaron en Tris 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM y 1% de solución amortiguadora de lisis NP40 complementada con leupeptina (Sigma Aldrich) y aprotinina (Sigma Aldrich). Las concentraciones de proteína se determinaron usando el kit BCA (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los lisados de proteína (50 μg) se resolvieron electroforéticamente por SDS/PAGE, se transfecaron a la membrana nitrocelulosa y se sondearon con los siguientes anticuerpos primarios contra: Raf-1 (1:300, Sc-133; Santa Cruz), FLT3 (1:1000, sc-480; Santa Cruz) y β-actina (1:2000, A1978; Sigma). Las membranas luego se incubaron con una dilución de 1:3000 de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante correspondiente. La detección se llevó a cabo usando el Sistema de Detección de Quimioluminiscencia Mejorado con ECL (Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6.3.4. Ensayo de células madre tumorales

Ensayo de ligación de PU-H71 – Las muestras primarias se colocaron en placas de 48 pocillos a 2×10^6 células/ml, y se trataron con 1 μM de PU-H71-FITC2 o TEG-FITC. A las 4 horas postratamiento las células se lavaron una vez con solución amortiguadora FACS (PBS, 0.05% de FBS), y se tiñeron con anticuerpos CD34-APC, CD38-PE-CY7 y CD45-APC-H7 (BD Biosciences) en solución amortiguadora FACS (PBS + 0.5% de FBS) a 4°C durante 30 min antes de la tinción con 7-AAD (Invitrogen). El MFI del PU-H71-FITC2 ligado se evaluó en el citómetro de flujo BD-LSR II) y se normalizó a TEG-FITC. Los valores se representaron como la relación de ligación de PUH71-FITC en LSCs (ventana CD45dim, CD34+, CD38-) en relación con los linfocitos (ventana CD45hi vs SSC).

Ensayo de viabilidad de células madre – Células primarias se colocaron en placas de 48 pocillos a 2×10^6 células/ml, y se trataron con 1 μM de PU-H71 durante 48 horas. Las células se tiñeron con anticuerpos CD34-APC, CD38-PE-CY7 y CD45-APC-H7 (BD Biosciences) en solución amortiguadora FACS (PBS, 0.05% de FBS) a 4°C durante 30 min antes de la tinción con Anexina V-V450 (BD Biosciences) y 7-AAD en solución amortiguadora de Anexina V (HEPES/NaOH, NaCl 10 mM, CaCl₂ 2.5 mM). La viabilidad celular se determinó como el porcentaje de células de Anexina V-/7AAD normalizadas a las células no tratadas.

40 **Análisis Estadístico.** A menos que se indique de otra manera, los datos se analizaron por pruebas t de 2 colas no emparejadas como se implementa en GraphPad Prism (versión 4; GraphPad Software). Un valor P menor que 0.05 se consideró significativo. A menos de que se establezca de otra manera, los datos se representan como la media±SD o media±SEM de replicados en duplicado o triplicado. Las barras de error representan la SD o el SEM de la media. Si un panel individual se presenta, los datos son representativos de 2 o 3 experimentos individuales.

45 6.3.5. Evaluación de la ligación de PU-FITC en muestras de leucemia primarias y en líneas de células de leucemia y de tumor sólido

Procedimiento: Células mononucleares de sangre periférica (PB) o medula ósea (BM) de pacientes con leucemia se aíslan ya sea de muestras recientes usando gradientes de densidad Ficoll o de alícuotas viablemente congeladas. Las células se trataron con 1 μM de PU-FITC y 4h postratamiento las células se lavaron y se tiñeron con anticuerpos para distinguir las subpoblaciones diferentes (CD45-APC-H7 para identificar los blastocitos (ventana CD45 dim contra SSC) y los linfocitos (ventana CD45hi contra SSC)) y la tinción con 7-AAD para discriminar las células muertas. La ligación de PU-FITC se evaluó usando un instrumento BD LSR-II. El instrumento se ajusta usando perlas CST antes del experimento. Una curva de calibración que usa perlas comercialmente disponibles etiquetadas con diferentes intensidades fluorescentes (kit Quantum Alexa Fluor 488) se usó para la cuantificación de las intensidades de fluorescencia AF488/FITC para la ligación de PU-FITC. La ligación a los linfocitos se usa para determinar la ligación de fondo de PU-FITC para cada muestra del paciente. La ligación PU-FITC se evaluó como la diferencia de plegamiento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) de los blastocitos en relación con los linfocitos. Se usó un control no específico (TEG-FITC) para determinar la ligación no específica. Los inventores

proponen evaluar por lo menos 100 muestras de leucemia primaria. Para cada ensayo los inventores usan un mínimo de 900.000 células mononucleares totales. Los inventores recolectan por lo menos 50.000 eventos para el análisis. El análisis se lleva a cabo usando el software FlowJo. La ligación de PU-FITC en un panel más grande de línea de células comercialmente disponibles (linfomas, mieloma múltiple, cáncer de mama, próstata, líneas de células cancerosas pancreático y de pulmón) se puede evaluar. Debido a que las líneas de células no tienen su propio control interno, los inventores usan el MFI delta calculado para el TEG-FITC sustraído de PU-FITC (cuantificado usando las curvas de calibración llevadas a cabo con las perlas fluorescentes) o la ligación a las células HL-60 como se describe en lo anterior.

Evaluación de la sensibilidad para los inhibidores de HSP90: Para determinar la sensibilidad de todas las muestras evaluadas para la ligación de PU-FITC, las células se colocaron en placas de 96 pocillos y se trataron con dosis cada vez mayores de PU-H71. En las líneas de células y un subconjunto de selección de muestras primarias, donde el material suficiente está disponible, su sensibilidad también se sometió a prueba a otra Hsp90i químicamente distinta (17-AAG, NVP-AUY922 y STA9090 u otra Hsp90i actualmente en evaluación clínica) (5). Las células se recolectaron 48h después y se tiñeron con CD45-APC-H7 para distinguir los blastocitos y los linfocitos normales (para las células primarias). Las células luego se lavaron y se tiñeron con Anexina V-V450 y 7-AAD en solución amortiguadora de Anexina V (10 mM HEPES/NaOH, NaCl 0.14 M, CaCl₂ 2.5 mM). La viabilidad celular se analizó por citometría de flujo.

Consideraciones estadísticas: El objetivo primario de los inventores es evaluar el ensayo para plegar la ligación de PU de modo que distingue mejor los respondedores de Hsp90i contra no respondedores. Estos experimentos se hicieron in vitro, usando 150 muestras, incluyendo muestras primarias y líneas de células. La respuesta se definió si más del 50% de las células estaban vivas. El área bajo la curva característica de operación receptora (ROC) se calculó para evaluar la capacidad de la ligación de PU de plegamiento en la distinción de la respuesta contra no respuesta. Para los propósitos de los inventores, los inventores definieron una AUC de .87 o más alta (comparada con una AUC nula de .75) para indicar que la ligación de PU de plegamiento puede distinguir a los respondedores Hsp90i de los no respondedores. Para una muestra de 150, y asumiendo un 30% de tasa de respuesta, los inventores tendrán 80% de potencia para detectar una diferencia de la AUC de .75 a .87 con error de tipo I de 5%. Conforme la tasa de respuesta disminuye, la potencia también disminuye. Como un ejemplo, si se asumió un 20% de tasa de respuesta, los inventores tendrán 80% de potencia para detectar una diferencia en la AUC de .75 a .89 con un error de tipo I de 5%.

6.3.6. Medición de la ligación de PU-FITC en líneas de células Tumorales Vivas en presencia o ausencia de inhibidores de pgp

Líneas de células cancerosas adherentes se colocaron en placas y se las dejó adherir durante la noche a 37°C, 5% de CO₂. Las células ya sea se trataron previamente (5uM) con los inhibidores de pgp (PSC 833, Tocris Biosciences o Reversan, Tocris Biosciences) o vehículo de DMSO durante 2hrs antes de la adición del medio que contiene 1uM de DMSO, PU-FITC9 (un control de PU-FITC negativo) y PU-FITC2 (fármaco PU-H71 etiquetado con FITC). Las células se incubaron con el fármaco FITC o conjugados de control durante 4hrs adicionales, a 37°C, CO₂ al 5%. Las células luego se tripsinizaron, se lavaron dos veces con 1X de solución amortiguadora FACS (1X de PBS+0.5% de FBS) y el peletizado se volvió a suspender en 500ul de 1X de solución amortiguadora FACS que contiene un tinte de viabilidad celular (1µg/ml de DAPI). Las muestras se corrieron sobre el citómetro de flujo BD LSRII y se recolectaron 10-20.000 eventos, antes de cada corrida experimental, se normalizaron los láseres en el LSRII con perlas de CST (BD Biosciences). La ligación del PU-FITC en las células tumorales se determinó en las células vivas con DAPI-ve al medir la intensidad de fluorescencia media FITC (MFI). La señal FITC no específica de los controles FITC9 y DMSO se sustraio de la señal PU-FITC.

6.3.7 Células Tumorales Disociadas y Células Tumorales Circulantes

Disociación de Células Tumorales y medición la ligación de PU-FITC – Tumores EGFR+ obtenidos de ratones se disasociaron de acuerdo con el protocolo del fabricante (kit de disociación de tejido, Millipore). Brevemente, 1 g de tejido reciente se cortó en piezas pequeñas (por ejemplo, ~10-20 piezas por g de tejidos) usando un escalpelo. El tejido cortado se lavó dos veces en PBS y se transfirió en la solución de disociación durante 50mins a 37°C con agitación leve. Después de la disociación, las células se lavaron, se tiñeron usando una criba y los fragmentos de tejido no disociados se eliminaron. El tejido disociado se transfirió a un tubo reciente que contiene 1X de Solución Amortiguadora de Disociación con Inhibidores de Proteasa. Las células se lavaron dos veces en la solución amortiguadora de disociación que contiene inhibidores de proteasa. Las células se volvieron a suspender a 1 x 10⁶ células/ml en el medio. Las muestras se dividieron igualmente en 3 tubos de células y se trataron con 1µM (por 1 x 10⁶ células/ml) de DMSO, PU-FITC9 (control FITC negativo) y PU-FITC2 (fármaco PU-H71 etiquetado con FITC) durante 4hrs a 37°C, 5% de CO₂. Líneas de células EGFR+ de control [Aspc1 (Baja ligación); BxPc3 (alta ligación)] enriquecidas con PBMC descongeladas obtenidas del banco de sangre se tiñeron concurrentemente con las células tumorales disociadas como se menciona en lo anterior. Las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora 1XFACS (1XPBS+0.5% de FBS) y se tiñeron durante 30mins sobre hielo con EGFR-PE antihumano (BD Biosciences), CD14-APC-Cy7 antihumano (ebiosciences) o CD14- PE-Rojo Texas (invitrogen) y CD45-APC antihumano (ebiosciences). Las células luego se lavaron dos veces con solución amortiguadora 1XFACS (1XPBS+0.5% de FBS) y el peletizado se volvió a suspender en 500ul de solución amortiguadora 1X FACS que

contiene un tinte de viabilidad celular (1ug/ml de DAPI). Las muestras se corrieron en el citómetro de flujo BD LSRII y se recolectaron 100-200.000 eventos. Los láseres se normalizaron en LSRII con perlas de CST (BD Biosciences) antes de cada corrida experimental. La acumulación del fármaco de PU-FITC en las células tumorales se determinó por la Medición de la Intensidad de la Fluorescencia Media FITC (MFI) en células EGFR+ (EGFR+CD45-) y células EGFR- (EGFR-CD45+CD14-). La señal de FITC no específica de los controles PU-FITC9 y de DMSO se sustrajo. Los valores se calcularon como una relación del MFI de Tumor (EGFR+CD45-CD14-); MFI de células EGFR-CD45+CD14-. Para normalizar los valores MFI a través de las perlas de estandarizaciones Quantum FITC de paciente (Bangs laboratories) se ejecutaron con cada muestra y se generó una curva estándar. Esto permite la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de FITC en las moléculas de fluorocromo soluble equivalente (unidades MESF). La acumulación de PU-FITC2 en cada muestra se puede cuantificar a través de las muestras al extrapolar los valores generados de la curva estándar.

Medición de la ligación de PU-FITC a las células tumorales EpCAM+ en PBMC: Todos los procedimientos de muestreo de sangre experimentales se llevaron a cabo bajo los Protocolos Aprobados por la Junta de Revisión Institucional en Memorial Sloan Kettering Cancer Center. 8mls de sangre periférica se retiraron en tubos de EDTA anticoagulantes de pacientes con cáncer enrolados en ensayos clínicos de PU-H71. Las PBMC se aislaron en gradientes ficol, las células se contaron y la viabilidad se determinó por el ensayo de exclusión de tinte Azul Tripán. Las PBMC se centrifugaron y se volvieron a suspender a 2×10^6 células/ml. Las muestras se dividieron igualmente en 3 tubos y se trataron con 1 μ M (por 2×10^6 células/ml) de DMSO, PU-FITC9 (control FITC negativo) y PU-FITC2 (fármaco PU-H71 etiquetado con FITC) durante 4hrs a 37°C, 5% de CO₂. Las líneas de células EpCAM+ de control [Aspcl (Baja ligación); BxPc3 (alta ligación)] se enriquecieron con PBMC recientemente descongeladas obtenidas del banco de sangre y se tiñeron concurrentemente con las PBMC de pacientes como se menciona en lo anterior. Las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora 1XFACS (1XPBS+0.5% de FBS) y se tiñeron durante 30mins sobre hielo con EpCAM-PE antihumano (miltenyi biotech), CD14-APC-Cy7 antihumano (ebiosciences) o CD14- PE-Rojo Texas (invitrogen) y CD45-APC antihumano (ebiosciences). Las células luego se lavaron dos veces con solución amortiguadora 1XFACS (1XPBS+0.5% de FBS) el peletizado se volvió a suspender en 500ul de solución amortiguadora 1X FACS que contiene un tinte de viabilidad celular (1ug/ml de DAPI). Las muestras se corrieron sobre el citómetro de flujo BD LSRII y se recolectaron 100-200.000 eventos. Los láseres se normalizaron en el LSRII con perlas de CST (BD Biosciences) antes de cada corrida experimental. La ligación de PU-FITC en las células tumorales se determinó al medir la Intensidad de Fluorescencia Media FITC (MFI) en células EpCAM+ (EpCAM+CD45-) y celulas EpCAM- (EpCAM-CD45+CD14-). La señal de FITC no específica de los controles FITC9 y DMSO se sustrajo. Los valores se calcularon como una relación del MFI de Tumor (EpCAM+CD45-CD14-); MFI de células EpCAM-CD45+CD14-. Para normalizar los valores de MFI a través de las perlas de estandarizaciones de FITC Quantum de paciente (Bangs laboratories) se ejecutaron con cada muestra de paciente y se generó una curva estándar. Esto permite la cuantificación de la intensidad de fluorescencia FITC en las moléculas de fluorocromo soluble equivalente (unidades MESF). La ligación de PU-FITC2 en cada muestra se puede cuantificar a través de las muestras al extrapolar los valores generados de la curva estándar.

Modificaciones al protocolo: Las PBMC obtenidas de pacientes se dividirán en dos tubos. Ambas se teñirán con PU-FITC como se mencionó en lo anterior, y se teñirán con EpCAM-PE o el control isotípico y CD14-PE-rojo Texas y CD45-APC. Las muestras se procesarán como se menciona en lo anterior. Los valores de relación de umbral se determinarán usando las líneas de células de acumulación baja y alta PU-FITC enriquecidas con PBMC.

6.3.8. Análisis de la ligación de PU-H71 en los tejidos

Examen de la sensibilidad de muestras de tumor gástrico de paciente a inhibidores de HSP90 usando recursos de tejido de tumor ex vivo y correlacionándose con la tinción de PU-H71-FITC: Inmediatamente después de la remoción quirúrgica de la muestra de gastrectomía el tejido se transportó al área de Servicios de Recuperación de Tejido (TPS) de la sala de Patología. Una vez que la lesión se localizó, el tejido se recolectó bajo condiciones estériles. El tamaño de la muestra removida para evaluación es típicamente de 5-10mm x 5-10 mm. Se hizo todo lo posible para muestrear el área más viable. Lejos de la lesión, una muestra de tamaño equivalente se removió representativa del tejido epitelial gástrico normal. Ambas muestra se colocaron en un medio esencial mínimo (MEM) con 1% de penicilina/estreptomicina. Una pequeña porción de la lesión y la pieza completa del tejido epitelial gástrico normal se sometió a una congelación "instantánea" para evaluación molecular adicional por WB. La porción restante de la lesión (gastrectomía) se procesó para evaluación patológica. Para cada lesión, la patología proporcionó IHC para los marcadores de proliferación, marcadores epiteliales y una porción teñida con hematoxilina/eosina (H&E) acompañada por 10 no teñidas que se evaluaron adicionalmente para tinción con PU-H71 etiquetado con fluoresceína (PU-FITC). Las secciones incrustadas en parafina fijadas en formalina o secciones congeladas se analizaron para la tinción de PUH71-FITC2. En paralelo, se preparó una porción del tejido para el análisis ex vivo de la sensibilidad del tumor a PU-H71. De los análisis preliminares los inventores han aprendido que la porción de tejido reciente conserva las células cancerosas en el entorno endógeno del tejido circundante. En este método, el tejido (es decir la lesión) se colocó en un molde de plástico y se incrustó en 6% de agarosa. El tejido incrustado en agarosa luego se montó en la etapa del Vibratome que se sumergió en un depósito enfriado (para la conservación del tejido) que contiene MEM con 1% de penicilina/estreptomicina. El tejido luego se cortó en rodajas usando cuchillas de metal que producen secciones en serie de la lesión que son de 200 μ m de espesor. Cada sección (menos los medios incrustados en agarosa circundante) se colocaron inmediatamente en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos que contiene MEM con 1% de penicilina/estreptomicina. De una pieza de 5mm x 5mm

de tejido aproximadamente se produjeron 25 secciones. Esto permite replicar los análisis de las secciones de tejido tratadas con un mínimo de 4 dosis del inhibidor de HSP90 y una con vehículo solamente. Los replicados se sometieron a ensayo por tanto IHC así como ensayos de viabilidad (lector de placas automático o preparación de citospina) una vez que la sección de tejido se sometió a la disociación enzimática por breve exposición a la dispasa.

- 5 El grado de apoptosis inducida por PU-H71 en las porciones de tumor gástrico luego se correlacionaron con la tinción de PU-H71-FITC. La captación de PU-H71 (como es medida por el registro IHC de la tinción de PU-H71-FITC) se correlaciona con la sensibilidad de estos tumores a la inhibición de Hsp90. Se han desarrollado protocolos similares para el cáncer de mama y pancreático.

6.4. Sondas etiquetadas con ANCA en ensayos celulares

- 10 **Tratamiento de sondas fluorescentes:** Las células adherentes se trataron cuando tuvieron una confluencia del 70% con PUH71-ANCA 5 μ M durante 1 hora bajo condiciones de cultivo de tejido estándares. Después del tratamiento el medio se aspiró, las porciones se lavaron 3 veces con PBS y luego se reabastecieron con medio completo.

- 15 **Espectro de Emisión de Fluorescencia:** La emisión de fluorescencia se determinó usando un microscopio confocal fluorescente invertido (Leica SP₅) y explorando las células cancerosas y no cancerosas en las porciones de la cámara en incrementos de 5nm de 400nm a 600nm.

- 20 **Microscopía Confocal:** Despues del tratamiento, la fluorescencia de las células se observó usando un microscopio confocal fluorescente invertido (Leica SP₅). Las imágenes confocales se adquirieron en el pico de emisión de fluorescencia apropiado de las especies de alta afinidad ligadas (~530nm). Las imágenes se cargaron el software NIH ImageJ. La intensidad de fluorescencia de las células individuales de varios campos aleatorios se midió y se corrigió para antecedentes.

- 25 **Modelación de Respuesta:** Una curva estándar de IC₅₀ vs. integridad de densidad de fluorescencia se estableció para 12 líneas de células cancerosas de mama y 2 líneas de células de mama normales. Las líneas de células se desarrollaron sobre placas de múltiples pocillos donde cinco pocillos se analizaron para la respuesta (vehículo solamente, 0.25 μ M, 0.50 μ M, 1.0 μ M y 2.5 μ M de PUH71-tratado) y uno se analizó para intensidad de fluorescencia del ligado (PUH71-ANCA-tratado). La IC₅₀ de todas las líneas de células se graficó en el eje Y y la integridad de la densidad (intensidad de fluorescencia) se graficó en el eje x. La curva estándar se usó para modelar y predecir la respuesta de las muestras de cáncer de mama, tales como aquellas obtenidas de la biopsia, cirugía o aspirados con aguja fina, a la terapia de HSP90.

- 30 **Medición de Respuesta en Biopsias de Cáncer:** Las biopsias de pacientes, una vez recuperadas se colocaron en solución salina estéril y se enviaron inmediatamente al área de recuperación de tejido del Departamento de Patología. Una porción de la lesión se tomó para el seccionamiento de tejido reciente llevado a cabo en un Vibratome (Leica VT1000). Las Secciones de 200 μ m de grueso se cortaron y se colocaron inmediatamente en placas de múltiples pocillos en un medio esencial mínimo con factores de crecimiento y antibióticos y se colocaron a 37°C en una atmósfera de aire-CO₂ al 5% en humedad constante. Las secciones luego se trataron con el PUH71-ANCA durante 45 minutos a 1 hora. Después del tratamiento, la sección se lavó 2X con PBS y luego se incrustó en OCT (congelada reciente). La muestra incrustada en OCT luego se cortó en varias secciones de 4 μ m de grueso y se transfirieron a portaobjetos cargados. La contra-tinción nuclear, DAPI luego se aplicó al portaobjetos. Los portaobjetos luego se observaron en un microscopio confocal (Leica SP₅) y se analizaron a 530nm de pico de emisión fluorescente para determinar el porcentaje de la sonda ligada a las especies HSP90 oncogénicas.

6.5. Estudios con inhibidores de HSP90 radioetiquetados

Reactivos. [¹³¹I]-PU-H71 y [¹²⁴I]-PU-H71 se sintetizaron y se purificaron como se reportó previamente ¹³².

- 45 **Líneas de Células.** La línea de células cancerosas de mama MDA-MB-468 se obtuvo de la Recolección de Cultivo de Tipo Americano. Las células se cultivaron rutinariamente en DME-HG complementado con 10% de FBS, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina y estreptomicina.

- 50 **Estudios In Vivo.** Todos los estudios animales se condujeron de conformidad con las directrices del Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional (IACUC) del MSKCC. Ratones nu/nu atípicos hembras (NCRNU-M, 20 – 25 g, de 6 semanas de edad) se obtuvieron de Harlan Laboratories y se les permitió aclimatarse en el vivero del MSKCC durante 1 semana antes de implantar los tumores. A los ratones se les proporcionó alimento y agua ad libitum. Los xenoinjertos de tumor MDA-MB-468 se establecieron en las extremidades delanteras de los ratones por inyección subcutánea (s.c.) de 1×10⁷ células en 200 μ L de una suspensión celular de una mezcla v/v 1:1 de PBS con membrana basal reconstituida (BD MatrigelTM, Collaborative Biomedical Products Inc., Bedford, MA). Antes de la administración, una solución de PU-H71 se formuló en PBS (pH 7.4).

- 55 **Estudios de Biodistribución In vivo.** Para los estudios de biodistribución *in vivo* agudos, ratones (n=5) con xenoinjertos de tumor de mama MDA-MB-468 en las extremidades delanteras se inyectaron intravenosamente en la vena de la cola con 0.93-1.1 de MBq (25 - 50 μ Ci) de [¹²⁴I]-PU-H71 o [¹³¹I]-PU-H71 en 200 μ L de solución salina. Para los experimentos de estimación de dosis los grupos de ratones (n=5) se inyectaron con [¹²⁴I]-PU-H71 o [¹³¹I]-

PU-H71 diluidos en una solución estéril que contiene PU-H71 que corresponde a 5, 25, 50 o 75 mg/kg de peso corporal de los ratones. La actividad en la jeringa antes y después de la administración se sometió a ensayo en un calibrador de dosis (CRC-15R; Capintec) para determinar la actividad administrada a cada animal. Los animales (n=4 por grupo) se sacrificaron por asfixia de CO₂ en diferentes puntos de tiempo posteriores a la administración del trazador y los órganos incluyendo los tumores se reconectaron y se pesaron. Parte del tejido tumoral se congeló inmediatamente después de la recolección para los análisis bioquímicos e histológicos adicionales. ¹²⁴I se midió en un contador y de centelleo (Perkin Elmer 1480 Wizard 3 Auto Gamma counter, Waltham, MA) usando una ventana de energía de 400-600 keV. Los datos de conteo fueron de fondo y la descomposición se corrigió en el momento de la inyección, y el porcentaje de la dosis inyectada por gramo (%ID/g) para cada muestra de tejido se calculó al usar un factor de calibración medido para convertir la velocidad de conteo para la actividad y la actividad se normalizó respecto a la actividad inyectada para producir la concentración de actividad en % de ID/g.

Formación de Imágenes de PET de Animales Pequeños. Para los estudios de formación de imágenes de animales pequeños se usaron ratones con xenoinjertos de cáncer de mama MDA-MB-468 en las extremidades delanteras. La formación de imagen se llevó a cabo con un escáner de PET de animal pequeño dedicado (Focus 120 microPET; Concorde Microsystems, Knoxville, TN). Los ratones se mantuvieron bajo 2% de anestesia de isofluorano (Baxter Healthcare, Deerfield, IL) en oxígeno a 2 L/min durante el período de exploración completo. En casos adecuados, para reducir la captación de la tiroideas de yodo libre que surge del metabolismo del trazador, los ratones recibieron 0.01% de solución de yodo de potasio en su agua para beber comenzando 48 horas antes de la administración del trazador. Para la formación de imágenes de PET, a cada ratón se le administró 9.25 de MBq (250 µCi) de [¹²⁴I]-PU-H71 a través de la vena de la cola. Las adquisiciones de modo de lista secuenciales (10-30 min) se obtuvieron para cada animal en varios puntos de tiempo posteriores a la administración del trazador. Se usaron una ventana de energía de 420–580 keV y una ventana de tiempo de coincidencia de 6 ns. Los datos del modo de lista resultantes se clasificaron en histogramas bidimensionales por el reformato de Fourier; imágenes transversas se reconstruyeron por la proyección posterior zafiltrada (FBP). Los datos de imágenes se corrigieron para no uniformidad de las respuestas del escáner, pérdidas de conteo de tiempo muerto, y descomposición física al tiempo de la inyección. No hubo corrección aplicada para la atenuación, dispersión o promedio de volumen parcial. La resolución espacial reconstruida medida del Foco 120 es 1.6-mm FWHM en el centro del campo de observación. El análisis ROI de las imágenes reconstruidas se llevó a cabo usando el software ASIPro (Concorde Microsystems, Knoxville, TN), y el valor de pixeles máximo se registró para cada ROI de tejido/órgano. Un factor de calibración del sistema (es decir, µCi/mL/cps/voxel) que se derivó de imágenes reconstruidas de un cilindro llenado con agua de tamaño de ratón que contiene ¹⁸F y se usó para convertir las velocidades de conteo voxel ¹²⁴I para las concentraciones de actividad (después del ajuste para la relación de ramificación de positrones ¹²⁴I). Los datos de imágenes resultantes luego se normalizaron a la actividad administrada para formar en parámetros las imágenes microPET en términos de % de ID/g (corregida para la descomposición al tiempo de la inyección).

Análisis LC-MS/MS. El tejido congelado se secó y se pesó antes de la homogenización en acetonaítrilo/H₂O (3:7). El PU-H71 se extrajo en cloruro de metileno, y la capa orgánica se separó y se secó bajo vacío. Las muestras se reconstituyeron en fase móvil. Las concentraciones de PU-H71 en el tejido o plasma se determinaron por LC-MS/MS de alto desempeño. El PU-H71-d₆ se agregó como el estándar interno¹³³. El análisis compuesto se llevó a cabo en el sistema 6410 LC-MS/MS (Agilent Technologies) en el modo de supervisión de reacción múltiple (MRM) usando ionización de electroroció de ión positivo. Para las muestra de tejido, se usó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1 x 50 mm, 3.5 µm) para la separación LC, y el analito se eluyó bajo una condición isocrática (80% de H₂O+0.1% de HCOOH: 20% de CH₃CN) durante 3 minutos en una velocidad de flujo de 0.4 mL/min. Para las muestras de plasma, se usó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 50 mm, 5 µm) para la separación LC, y el analito se eluyó bajo una condición gradiente (H₂O+0.1% de HCOOH:CH₃CN, 95:5 a 70:30) en una velocidad de flujo de 0.35 mL/min.

Análisis Farmacodinámicos. Para el análisis de proteína, los tumores se homogenizaron en solución amortiguadora de lisis SDS (Tris 50 mM, pH 7.4, 2% de SDS) y se sometieron a análisis Western blot. Las concentraciones de proteína se determinaron usando el kit BCA (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los lisados de proteínas (20–100 µg) se resolvieron electroforéticamente por SDS/PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y se sondearon con anticuerpos primarios indicados: Anti-Hsp90 de ratón (1:500, SPA-830; Stressgen), anti-Akt de conejo (1:500, 9272; Cell Signaling), anti-fosfo-Akt (Ser 473) de conejo (1:500, 9271S; Cell Signaling), anti-PARP (fragmento p85) de conejo (1:250, G7341; Promega). Las membranas luego se incubaron con una dilución de 1:5000 de un anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa. Una carga igual de las muestras de proteína se confirmó por los análisis de Western blots paralelos para β-actina (1:5000, ab8227-50; Abcam). La detección se llevó a cabo usando el Sistema de Detección de Quimioluminiscencia Mejorado con ECL (Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Densitometría. Los geles se escanearon en Adobe Photoshop y se llevó a cabo el análisis densitométrico cuantitativo usando el Un-Scan-It 5.1.

Estudios de Eficacia. Ratones (n=5) que llevan tumores MDA-MB-468 que alcanzan un volumen de 100–150 mm³ se trajeron i.p. (i.p.) usando diferentes dosis y programas, como se indicó. El volumen total se determinó por la medición con los calibradores Vernier, y el volumen del tumor se calculó como el producto de su longitud x ancho² x 0.4. El volumen del tumor se expresó en lo días indicados como el volumen de tumor medio ± SD indicado para los

grupos de ratones. El porcentaje (%) de los valores de inhibición del crecimiento del tumor se midieron en el día final del estudio para los ratones tratados con fármaco comparados con los tratados con vehículo y se calcularon como $100 \times \{1 - [(Tratado_{Día\ final} - Tratado_{Día\ 1}) / (Control_{Día\ final} - Control_{Día\ 1})]\}$. Los valores de regresión del tumor se determinaron al calcular la relación de los volúmenes del tumor medios en el tiempo cuando el tratamiento se inició respecto del volumen de tumor medio en el día final del estudio para un grupo de tratamiento dado. El porcentaje (%) de la regresión del tumor es $100 \times [1 - (Tratado_{Día\ final} / Tratado_{Día\ 1})]$.

Ensayo de Viabilidad Celular con Anaranjado Acrídina/Bromuro de Etidio. Se usó el kit Easycount ViaSure (Immunocon) en conjunción con el sistema Easycount para contar las células muertas y vivas automáticamente. El Re却ivo de Tinción ViaSure usa una mezcla de tintes de ácido nucleico listos para usar, anaranjado acridina y bromuro de etidio, para identificar las células vivas y muertas, respectivamente, en una sola prueba. El anaranjado acridina es captado por las células tanto viables como no viables y emite una fluorescencia verde si se intercala en el ácido nucleico de doble hebra (DNA) o fluorescencia roja si se liga al ácido nucleico de hebra individual (RNA). El bromuro de etidio se captó solamente por las células no viables y emitió una fluorescencia roja por la intercalación en DNA. Las células viables tienen núcleos verdes uniformes con estructura organizada. Las células apoptóticas tempranas (que aún tienen las membranas intactas pero han comenzado a someterse a la escisión de DNA) tienen núcleos verdes, pero la condensación de cromatina perinuclear es visible como los parches verdes brillantes o fragmentos. Las células apoptóticas tardías tienen núcleos anaranjados a rojos con cromatina condensada o fragmentada. Las células necróticas tienen núcleos uniformemente anaranjados a rojos con estructura organizada. Se contó un total de por lo menos 200 células por condición.

Simulaciones. Una función exponencial doble $x(t) = \alpha_1 \exp(-\beta_1 t) + \alpha_2 \exp(-\beta_2 t)$ se ajustó a las mediciones. En general, la suma de los exponentiales se ha usado para analizar los datos farmacocinéticos¹²³. El paquete Generalized Nonlinear Model (<http://cran.r-project.org/web/packages/gnm/index.html>) en el lenguaje estadístico R (www.r-project.org) se ha usado para ajustar el modelo a los datos. Varios ajustes se buscaron inicialmente, y el mejor se empleó para las simulaciones adicionales de diferentes escenarios de administración de fármacos. Se había desarrollado una secuencia de comandos en R.

Análisis Estadístico. A menos que se indique de otra manera, los datos se analizaron por pruebas t de 2 colas no pareadas como es implementado en GraphPad Prism (versión 4; Software GraphPad). Un valor P menor que 0.05 se consideró significativo. A menos que se indicara de otra manera, los datos se representan como la desviación media ± estándar (SD) o error media ± estándar de la media (SEM) de los replicados en duplicado o triplicado. Las barras de error representan el SD o SEM de la media. Si se presenta un panel individual, los datos son representativos de 2 o 3 experimentos individuales.

Estudios Humanos. Una dosis una vez al día de una solución de yodo de potasio (SSKI) se administró durante 14 días comenzando en el día antes de la inyección. Una sola inyección de trazador (4-11.0 mCi; <100 µg) se administró por bolo IV periférico lento. Los pacientes se sometieron a ensayos basados en PET no invasivos a 0h (escaneo dinámico), 3-4h, 24h y 40-80 h y/o 160-200 h (escaneo estático). En el ensayo piloto PU-PET, un programa más demandante se había tolerado bien por los pacientes sin dificultades en el reclutamiento de pacientes o "deserción". Los puntos de tiempo se seleccionaron basados en los datos ¹²⁴I-PUH71 PK humanos:

- (1) ¹²⁴I-PUH71 se elimina rápidamente de la circulación de la sangre, en una manera biexponential, una eliminación rápida (sangre $t_{1/2} \approx 20$ min.), seguido por la eliminación lenta en los niveles de sangre insignificantemente bajos;
- (2) las concentraciones de trazador PUH71 tumoral por la formación de imágenes PET, ha sido variable, siendo ya sea cuantitativamente mayor que o equivalente a los niveles de trazador de tejido de fondo, con captación y/o retención diferencial del trazador que es evidente de 4 a 24 o 48 y más allá de 72 horas después de la inyección del trazador;
- (3) las concentraciones tumorales ávidas de PUH71 ya sea se han sostenido o han mostrado una eliminación de tipo monoexponencial, durante un período de días.

Los inventores han optimizado su protocolo de adquisición de imágenes de PET de ¹²⁴I-PUH71 para asegurar las estadísticas de conteo sólidas. Un escáner de PET/CT de búsqueda dedicada (GE Discovery DSTe) obtiene las imágenes de biodistribución cuantitativas con correcciones de atenuación, descomposición y dispersión y ajuste para la sensibilidad del sistema. Los escaneos CT para la corrección de atenuación y el corregistro anatómico se llevaron a cabo antes de la inyección del trazador, escalado al peso corporal (hasta 85 mA para ≥81 kg). El protocolo CT se diseñó para satisfacer la localización anatómica de la señal del trazador y para la corrección de atenuación, mientras que minimiza la exposición a la radiación. No se administra un contraste radiográfico intravenoso u oral. Los datos de PET se reconstruyeron usando un algoritmo iterativo de maximización esperado de subconjunto ordenado estándar. Los datos de emisión se corrigieron para dispersión, atenuación y descomposición.

La avidez de tumor de PU es un resultado binario definido en la inspección visual de la formación de imágenes de PET, ya que la señal del trazador tumoral se evaluó como distintamente mayor que la acumulación de sangre de referencia o el fondo del órgano, en cualquier punto de tiempo. Las concentraciones de PU-H71 tumoral se

evaluaron cuantitativamente de los datos PET por (1) Valor de Captación Estandarizado de tumor más alto (SUV) en cualquier punto de tiempo; y (2) la integral del SUV tumoral como una función de tiempo posterior a la inyección de PU-H71 entre el primer y el último punto de tiempo de PET (es decir lecturas PU-PET SUVmax o concentraciones molares calculadas de las lecturas SUV según se grafican como una función de tiempo posterior a la administración de PU y valores AUC y las concentraciones tumorales promedio del inhibidor de HSP90 calculado como se muestra en la **Figura 27**).

Estos parámetros (u otros como se definen) luego, se correlacionaron con la respuesta en los ensayos terapéuticos con los inhibidores de HSP90. En estos estudios, la respuesta tumoral se evalúa por tumor y por paciente. Los momentos de las evaluaciones de la respuesta del tumor se determinaron de conformidad con el protocolo del ensayo de la terapia. La evaluación de la respuesta del tumor es de la formación de imágenes clínica llevada a cabo más cercana al final del 1 ciclo (un ciclo típicamente que es de 3-5 semanas). La respuesta tumoral se define por RECIST 1.1, para CT o MRI, y/o PERCIST 1.0 para FDG PET-CT (36,37). Si es discordante, la respuesta más favorable se usará. La respuesta clínica se evaluará de acuerdo con los criterios de respuesta de ensayo de terapia específica para el cáncer.

15 Los datos de avidez de PUH71 tumoral en la formación de imágenes de PET se dicotomizan en dos formas:

- (1) al usar un resultado binario de evaluación cualitativa/visual de los tumores que son “ávidos” o “no ávidos” (planteado en lo anterior);
- (2) al usar curvas ROC calculados para los datos agrupados, se calculará un punto de corte para la avidez de tumor que tiene las mejores características de operación en la discriminación entre respuesta de tumor contra no respuesta (40).

20 Para ambas dicotomizaciones, la sensibilidad, especificidad y otras mediciones de la clasificación se calcularon usando la respuesta del paciente como cierta. Si cada paciente tiene un tumor individual, un tamaño de muestra de 40 pacientes producirá un intervalo de confianza de dos lados con un ancho máximo de .324. Conforme el número de tumores por paciente se incrementa, el ancho del intervalo de confianza disminuirá generalmente en total. Un análisis exploratorio diseñado para encontrar una estadística de resumen de nivel de paciente para la avidez de tumor que se correlaciona mejor con la respuesta de nivel de paciente RECIST general se lleva a cabo. La estadística de resumen de nivel de paciente para la avidez que se investigó incluye 1) el SUV de tumor más alto y/o AUC y 2) el promedio de todos los SUV de tumor y/o AUCs. Estos datos de nivel de paciente se usaron para construir una curva ROC y se calculará un corte para la avidez de tumor resumida del paciente que se basa en el índice Youden y el punto más cercano a (0,1).

25 En los estudios preclínicos, la captación y retención en ciertos puntos de tiempo o durante un período de tiempo se correlacionan mejor con la respuesta observada. Los datos preliminares sugieren que tanto la retención de tumor prolongada (durante aproximadamente 24-48h) así como la exposición del tumor como es medida por AUC son parámetros pertinentes para predecir la respuesta tumoral a la terapia de inhibición de Hsp90. Específicamente, en 30 las investigaciones preliminares en los tumores MDA-MB-468, varios parámetros se calcularon tal como el área bajo la curva de tumor (AUC), las concentraciones tumorales promedio y mínimas de PU-H71, la ocupación objetivo medida como el promedio % de los sitios Hsp90 ocupados y reconocidos por PU-H71 ((% de sitios de Hsp90 ocupados)_{prom}) durante el tiempo de tratamiento. Los inventores descubrieron que la concentración tumoral promedio de PU-H71 registrada durante el tiempo de tratamiento, la AUC de tumor y el % de la ocupación de la “HSP90 oncogénica” se correlacionó significativamente bien con la magnitud del efecto antitumoral observado ($r^2 = 0.8162$, 0.8188 y 0.7559, respectivamente) (**Figura 37**). Estos sugieren que los parámetros más apropiados para predecir la respuesta a Hsp90i son aquellos que miden la exposición dependiente del tiempo, es decir captación y retención.

6.6. Estudios para identificar los marcadores predictivos de la sensibilidad apoptótica a HSP90 en cáncer de mama y AML

45 **Células:** Kasumi-1, SKNO-1, MOLM-13, M0-91, HEL, HL-60, THP-1, MV4-11 se desarrollaron en medio RPMI complementado con HEPES 10mM, 4.5g/L de glucosa, 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, piruvato de sodio 1mM, 10% de FBS, y 1% de penicilina/estreptomicina. Los transfectantes estables de FL5.12 se describieron previamente (18-Karnauskas 2003). En resumen, para la generación de FL5.mAKT la AKT miristilada se clonó en el vector inducible de doxiciclina pRevTRE (Clontech) (este clon se designó mAKT). Como un control, la célula se transfeció con el 50 vector solo (este clon se designó Vector). Para la generación de FL5.mAkt.Bcl-xL, el Bcl-xL cDNA humano se clonó en el sitio EcoRI del vector pBabePuro, y se transfeció en FL5.mAkt3 como se describe (18) (este clon se designó mAkt.Bcl-xL). Estas líneas se cultivaron como se describe previamente usando el medio DME-HG complementado con HEPES 10mM, 10% de medio FBS que contiene 1 mg/ml de Geneticina (G418) (Sigma #G9516) y 1 o 2 ng/mL de IL-3 (RD Systems#403 ML).

55 Los PBL (leucocitos de sangre periférica humana) se aislaron de sangre de paciente adquirida de New York Blood Center. Treinta y cinco ml de la suspensión celular se colocó en capas sobre 15 ml de Ficoll-Paque plus (GE Healthcare). Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 40 minutos a 4°C, y se recolectó la interfaz de leucocitos. Las células se colocaron en placas en medio RPMI con 10% de FBS y se trataron al siguiente día con

concentraciones apropiadas de PU-H71 para los tiempos indicados.

Reactivos: Los inhibidores de HSP90 se sintetizaron como se reportó previamente. Los inventores adquirieron de Calbiochem el inhibidor Akt VIII, Isozima-Selectiva, Akti-1/2 (#124018), el inhibidor PD98059 MEK (#513000) y el inhibidor I pan-JAK (#420099). Estos compuestos se usaron en concentraciones como se indica por el vendedor para dar por resultado la inhibición de sus vías objetivo. Todos los compuestos, excepto para los estudios *in vivo*, se usaron como soluciones madre de DMSO.

Inhibición de Crecimiento: Se llevaron a cabo estudios de inhibición de crecimiento usando el ensayo de azul Alamar. Este reactivo ofrece una medición objetivo rápida de viabilidad celular en el cultivo celular, y usa el tinte indicador resazurina para medir la capacidad metabólica de las células, un indicador de la viabilidad celular. Brevemente, las líneas de células AML exponencialmente en desarrollo se colocaron en una proporción 2×10^4 células/pocillo en placas de microtitulación (Corning # 3650) y se incubaron para los tiempos indicados a 37°C. Los fármacos se agregaron por triplicado en las concentraciones indicadas, y la placa se incubó durante 72 horas. Se agregó resazurina (55 µM), y la placa se leyó 6 horas después usando el GT (Modo de intensidad de fluorescencia, excitación 530nm, emisión 580nm, con 560nm de espejo dicroico). Los resultados se analizaron usando el software Softmax Pro. El porcentaje de la inhibición de crecimiento celular se calculó al comparar las lecturas de fluorescencia obtenidas de las células tratadas contra las de control, que totalizan la población de células iniciales (tiempo cero). La IC₅₀ se calculó como la concentración de fármaco que inhibe el crecimiento celular un 50%.

Ensayo de Apoptosis: Las células se trataron durante 24, 48 o 72 horas con vehículo (DMSO) o inhibidores como se indica. Después de la tinción con Anaranjado Acridina y Bromuro de Etidio (mezcla de 1:1 de 100 mg/ml), las células se visualizaron con un microscopio fluorescente (Zeiss Axiovert 40 CFL) y se contaron. El porcentaje de células apoptóticas se determinó de 200-300 células contadas en cada grupo. El porcentaje de células apoptóticas se calculó como: % de Células apoptóticas = (número total de células con núcleos apoptóticos/número total de células contadas) x 100. El anaranjado acridina se captó por tanto las células viables como no viables y emite una fluorescencia verde si se intercaló en el ácido nucleico de doble hebra (DNA) o fluorescencia roja si se ligó al ácido nucleico de hebra individual (RNA). El bromuro de etidio se captó solamente por las células no viables y emitió una fluorescencia roja por la intercalación en el DNA. Las células viables tienen núcleos verdes uniformes con estructura organizada. Las células apoptóticas tempranas (que aún tienen membranas intactas pero que han comenzado a experimentar la escisión de DNA) tienen núcleos verdes pero la condensación de cromatina perinuclear es visible como parches o fragmentos verdes brillantes. Las células apoptóticas tardías tienen núcleos anaranjados a rojos con cromatina condensada o fragmentada. Las células necróticas tienen núcleos anaranjados a rojos uniformes con estructura organizada.

Ensayo de la Activación de la caspasa 3,7: Las células se colocaron en placas y se trataron como se describe en la sección de ensayo de inhibición de crecimiento. Después de una exposición de 24h o 48h de las células a los inhibidores de HSP90, 100 µL de solución amortiguadora que contiene Hepes 10 mM, pH 7.5, EDTA 2 mM, 0.1% de CHAPS, 0.1 mg/ml de PMSF, mezcla Inhibidora de Proteasa Completa (#1697498; Roche), y el sustrato de caspasa Z-DEVD-R110 (#R22120; Molecular Probes) a 25 µM se agregaron a cada pocillo. Las placas se colocaron en un agitador orbital para promover la lisis celular y la reacción. La señal de fluorescencia de cada pocillo se midió en un lector de microplacas Analyst GT (Molecular Devices) (excitación de 485 nm; emisión a 530 nm). El porcentaje de incremento en la actividad de la caspasa-3,7 se calculó por comparación de la lectura de fluorescencia obtenida de las células tratadas contra control. Todos los datos experimentales se analizaron usando el SOFTmax Pro 4.3.1 y se graficaron usando Prism 4.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA).

Análisis de Western blot: Las células se desarrollaron a una confluencia de 60–70% y se trataron con inhibidor o vehículo para los tiempos indicados. Los lisados de proteína se prepararon en Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y 1% de solución amortiguadora de lisis NP-40. Las concentraciones de proteínas se midieron usando el kit de BCA (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los lisados de proteínas (10–100 µg) se resolvieron por SDS-PAGE, se transfecaron sobre una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con los anticuerpos primarios indicados. Para activar la AKT, se pretrataron líneas de células derivadas de FL5.12 con un 1 µg/ml Dox durante 18h antes del tratamiento con inhibidores.

Anticuerpos: Anti-AKT de conejo (1:500, 9272; Cell Signaling), anti-fosfo-AKT (Ser 473) de conejo (1:500, 9271S; Cell Signaling), anti-RAF-1 de conejo (1:300, sc-133; Santa Cruz Biotechnology), anti-PARP (fragmento p85) de conejo (1:250, G7341; Promega), anti-Bcl-xL de conejo (1:1000, 2762; Cell Signaling), anti-JAK2 de conejo (1:500, 3773; Cell Signaling), anti-c-KIT de ratón (1:1000, 3308; Cell Signaling), anti-AML1 de conejo (1:500, 4334; Cell Signaling), anti-FLT3 de conejo (1:1000, 3462; Cell Signaling), anti-TRKC de conejo (1:1000, ab43078; Abcam), STAT5, p-STAT5, p-ERK y anti-β-Actina de ratón (1:3000, ab8227-50; Abcam). Las membranas luego se incubaron con una dilución de 1:3000 de un anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa y las proteínas se detectaron a través del Sistema de Detección de Quimioluminiscencia mejorado con ECL (Amersham Biosciences).

Estudio Farmacodinámico: Los ratones hembras atípicos nu/un de 6 semanas de edad se obtuvieron de Taconic Farms. Los experimentos se llevaron a cabo bajo un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales, y se siguieron las directrices para el uso apropiado y humano de animales en la investigación.

5 Células HEL y M0-91 se implantaron subcutáneamente en el flanco derecho de los ratones usando una aguja de calibre 20 y se dejaron desarrollar. Antes de la administración, una solución de PU-H71:HCl se formuló en PBS estéril. Para este ensayo, los tumores se dejaron que alcanzaran 6-8 mm en diámetro antes del tratamiento. A los ratones que llevan tumores M0-91 y HEL se les administraron intraperitonealmente (i.p.) 75mg/kg de PU-H71. Los animales se sacrificaron por eutanasia con CO₂ 12, 24, 48, 72, y 96h después de la administración de PU-H71. Los tumores se homogeneizaron y las proteínas se analizaron por western blot como se describe en lo anterior.

10 **Densitometría.** Los geles se escanearon en Adobe Photoshop 7.0.1 y el análisis densitométrico cuantitativo se llevó a cabo usando Un-Scan-It 5.1.

15 **Estadística.** Los inventores llevaron a cabo los análisis estadísticos y el diagrama de gráfica con Prism 4.0 (GraphPad Software). Los inventores presentaron todos los datos como media ± s.d. Un valor *P* menor que 0.05 se consideró significativo.

20 **Fosfoflujo Stat5.**– Las células primarias se tiñeron con anticuerpos CD34-APC, CD38-PE-CY7 y CD45-APC-H7 (BD Biosciences) en solución amortiguadora FACS a 4°C durante 30 min. Las células se lavaron una vez, se fijaron con 4% de paraformaldehído a temperatura ambiente durante 30 min, y se permeabilizaron con PBS/0.1% de Triton X-100 sobre hielo durante 10 min. Las células se tiñeron con p-Stat5-PE o control de isotipo (BD Biosciences) a 4°C durante la noche. Las células luego se lavaron una vez con PBS, y se sometieron al análisis de citometría de flujo usando el citómetro de flujo BD-LSR II (BD Biosciences). La MFI de la tinción de p-Stat5 se normalizó al control de isotipo.

25 **Ensayo de la viabilidad de células madre** – Las células primarias se colocaron en placas de 48 pocillos a 2×10^6 células/ml, y se trataron con PU-H71 1 µM durante 48 h. Las células se tiñeron con anticuerpos CD34-APC, CD38-PE-CY7 y CD45-APC-H7 (BD Biosciences) en solución amortiguadora FACS (PBS, 0.05% de FBS) a 4 °C durante 30 min antes de la tinción de Anexina V-V450 (BD Biosciences) y 7-AAD en solución amortiguadora de Anexina V (10 mM HEPES/NaOH, NaCl 0.14 M, CaCl₂ 2.5 mM). La viabilidad celular se normalizó a las células tratadas.

25 **6.7. Estudios para identificar los pacientes neurodegenerativos susceptibles a la terapia de inhibición de HSP90**

30 El modelo transgénico de AD (3xTg-AD), que expresa la APPswe humana, PS1M146V y tauP301L, desarrolla progresivamente tanto la patología Abeta y tau en una manera dependiente de la edad en las regiones del cerebro relevantes de enfermedad (Billings y colaboradores, 2005; Oddo y colaboradores, 2005; Oddo y colaboradores, 2003). Este modelo de ratón se estableció mediante la conyección de los constructos de cDNA de App y tau en embriones de ratón deficientes de PS1M146. Estos ratones desarrollaron Aβ intracelular que precede la deposición de placa amiloide, consistente con las observaciones en pacientes con el deterioro cognitivo leve (MCI) y pacientes con síndrome de Down. También desarrollaron depósito Abeta extracelular antes de la formación de ovillos, permitiéndoles a los inventores estudiar los eventos implicados en estas dos etapas de desarrollo de AD. La patología de tau primero es evidente en las células piramidales de la región CA1 del hipocampo y progreso en la corteza, imitando el patrón de distribución en el cerebro AD humano (Mesulam, 2000). Por lo tanto, el modelo de ratón AD 3x-tg muestra muchas similitudes al AD humano y proporciona la oportunidad de estudiar el efecto y la retención de los Inhibidores de HSP90 en las regiones del cerebro patogénicamente afectadas y normales.

35 **Determinación de las concentraciones de fármaco en el cerebro y en plasma.** La solución acuosa del compuesto PU-HZ151 como la sal de HCl se administró i.p. a ratones 3×Tg AD (35 g de peso corporal promedio) en las dosis indicadas. Los ratones se sacrificaron por eutanasia con CO₂ en diferentes puntos de tiempo después del tratamiento de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del MSKCC. Los hemisferios se separaron en regiones corticolímbicas y subcorticales, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. El plasma se obtuvo de la sangre que se recolectó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL enfriado en hielo y se sometió a centrifugación. El tejido cerebral congelado se secó y se pesó antes de la homogeneización en acetonitrilo/H₂O (3:7). La mezcla se extrajo con cloruro de metíleno, la capa orgánica se separó y se secó bajo vacío. El plasma (50 µL) se mezcló con acetonitrilo (0.25 mL) y se centrifugó. Los sobrenadantes resultantes se secaron bajo vacío. Las muestras se reconstituyeron en fase móvil. Las concentraciones de compuesto en el cerebro y en el plasma se determinaron por LC-MS/MS de alto desempeño. Se agregó Haloperidol como el estándar interno. El análisis compuesto se llevó a cabo en el sistema 6410 LC-MS/MS (Agilent Technologies) en un modo de supervisión de reacción múltiple (MRM) usando la ionización de electropulverización de iones positivos. Una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1 x 50 mm, 3.5 µm) se usó para la separación de LC, y el analito se eluyó bajo una condición isocrática (65% de H₂O+0.1% de HCOOH: 35% de CH₃CN) durante 5 minutos a una velocidad de flujo de 0.35 ml/min.

40 **Análisis Farmacodinámicos.** Para el análisis de proteínas, la región del cerebro seleccionada (hipocampo) se homogeneizó en solución amortiguadora de lisis SDS (Tris 50 mM pH 7.4, 2% de SDS) y se sometió al análisis de Western blot. Los niveles de proteína se analizaron por inmunotinción con anticuerpos anti-Hsp70 y Hsp90.

7. MODALIDADES DE LA DIVULGACIÓN

45 La invención proporciona las siguientes modalidades enumeradas en los párrafos numerados a continuación:

1. Un método para determinar si un tumor probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

- (a) poner en contacto el tumor o una muestra que contiene células del tumor con un inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado que se enlaza preferiblemente a una forma específica de tumor de HSP90 presente en un tumor o células tumorales;
- (b) medir la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado al tumor o las células tumorales en la muestra; y
- (c) comparar la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado al tumor o las células tumorales en la muestra medida en la etapa (b) con una cantidad de referencia del inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado a células normales;

en donde una cantidad mayor de inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado al tumor o las células tumorales medida en la etapa (b) en comparación con la cantidad de referencia indica que el tumor probablemente responderá al inhibidor de HSP90.

2. Un método de la modalidad 1, en donde cuanto mayor sea la relación de la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado al tumor o las células tumorales medida en la etapa (b) en comparación con la cantidad de referencia, mayor será la magnitud de la respuesta posible a la terapia con inhibidor de HSP90.

3. Un método de la modalidad 1, en donde cuanto mayor sea la cantidad de inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado al tumor o las células tumorales medida en la etapa (a), mayor será la magnitud de la respuesta posible a la terapia con inhibidor de HSP90.

4. Un método de la modalidad 1, en donde la cantidad de referencia del inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado a células normales es la cantidad del inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado a células normales en la muestra que contiene las células del tumor.

5. Un método de la modalidad 1, en donde la cantidad de referencia del inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado a células normales es una cantidad predeterminada del inhibidor de HSP90 etiquetado enlazado a células normales en una muestra de referencia.

6. Un método de la modalidad 1, en donde el inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado está etiquetado fluorescentemente.

7. Un método de la modalidad 1, en donde el inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado está etiquetado con biotina.

8. Un método de la modalidad 1, en donde el inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado está etiquetado radioactivamente.

9. Un método de la modalidad 1, en donde el tumor está asociado con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, una leucemia que incluye leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, carcinoma de célula basal, melanoma, carcinoma de célula renal, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, un cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de célula pequeña y cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, neuroblastoma, trastornos mieloproliferativos, cánceres gastrointestinales incluyendo tumores estromales gastrointestinales, cáncer del esófago, cáncer del estómago, cáncer del hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer anal, tumores cerebrales incluyendo gliomas, linfomas incluyendo linfoma folicular y linfoma de célula B grande difuso, y cánceres ginecológicos incluyendo cánceres de ovarios, cervicouterino, y endometrial.

10. Un método de la modalidad 9, en donde el cáncer es cáncer de mama.

11. Un método de la modalidad 9, en donde el cáncer es una leucemia.

12. Un método de la modalidad 11, en donde la leucemia es leucemia mieloide crónica.

13. Un método de la modalidad 9, en donde el cáncer es cáncer gástrico.

14. Un método de la modalidad 9, en donde el cáncer es cáncer pancreático.

15. Un método de la modalidad 1, en donde la célula tumoral es una célula madre de tumor.

16. Un método de la modalidad 1, en donde en la etapa (a) el tumor se contacta, y está presente, en un sujeto.

17. Un método de la modalidad 1, en donde en la etapa (a) se contacta la muestra que contiene células tumorales y es una muestra de tejido.

18. Un método de la modalidad 1, donde la muestra de tejido es una muestra que se obtiene durante una biopsia, una aspiración de aguja fina o un procedimiento quirúrgico.
19. Un método de la modalidad 1, en donde en la etapa (a) se contacta la muestra y esta comprende un fluido biológico.
- 5 20. Un método de la modalidad 19, en donde el fluido biológico es sangre o médula ósea.
21. Un método de la modalidad 1, en donde en la etapa (a) se contacta la muestra y esta comprende células tumorales alteradas.
22. Un método de la modalidad 1, en donde en la etapa (a) se contacta la muestra y esta comprende células vivas.
- 10 23. Un método de la modalidad 1, en donde en la etapa (a) se contacta la muestra y esta comprende células congeladas.
24. Un método de la modalidad 1, en donde en la etapa (a) se contacta la muestra y esta comprende células fijadas y permeabilizadas.
25. Un método de la modalidad 1, en donde en la etapa (a) se contacta la muestra y esta comprende células incrustadas en parafina, fijadas con formalina.
- 15 26. Un método de la modalidad 1, en donde el inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado es una forma etiquetada del inhibidor de HSP90 a administrarse como terapia.
27. Un método de la modalidad 1, en donde el inhibidor de HSP90 a administrarse como terapia es PU-H71 o un análogo, homólogo o derivado de PU-H71.
28. Un método de la modalidad 27, en donde el inhibidor de HSP90 es PU-H71.
- 20 29. Un método de la modalidad 1, en donde el inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado es una forma de PU-H71 o de un análogo, homólogo, o derivado de PU-H71.
30. Un método de la modalidad 1, en donde el inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado es una forma de PU-H71.
31. Un método de la modalidad 30, en donde el inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado es [¹²⁴I]-PU-H71.
- 25 32. Un método de la modalidad 30, en donde el inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado es PU-H71-FITC2 o PU-H71-NBD1.
33. Un método de la modalidad 30, en donde el inhibidor de HSP90 detectablemente etiquetado es un análogo biotinilado de PU-H71.
- 30 34. Un método de la modalidad 33, en donde el análogo biotinilado de PU-H71 es PU-H71-biotina-5, PU-H71-biotina-6, PU-H71-biotina-8 o PU-H71-biotina-9.
35. Un método para determinar si un paciente con cáncer con un tumor que se visualiza en imágenes probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:
- (a) administrar al paciente un inhibidor de HSP90 radioetiquetado que se enlaza preferiblemente a una forma específica de tumor de HSP90 presente en el tumor o en células tumorales del tumor;
 - 35 (b) medir la absorción del inhibidor de HSP90 radioetiquetado por el tumor del paciente en una pluralidad de puntos de tiempo después de la administración en la etapa (a);
 - (c) medir la absorción del inhibidor de HSP90 radioetiquetado por un tejido saludable predeterminado del paciente en la misma pluralidad de puntos de tiempo después de la administración en la etapa (a);
 - 40 (d) computar la relación de la absorción medida en múltiples puntos de tiempo en la etapa (b) con la absorción medida en los mismos puntos de tiempo en la etapa (c); y
 - (e) determinar la probabilidad de que el paciente con cáncer responderá a la terapia con el inhibidor de HSP90, en donde una relación mayor a 2 computada en la etapa (d) en múltiples puntos de tiempo indica que el paciente probablemente responderá.
- 45 36. Un método de la modalidad 35, en donde el tumor está asociado con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, carcinoma de célula basal, melanoma, carcinoma de célula renal, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, un cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de célula pequeña y cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, neuroblastoma, cánceres

gastrointestinales incluyendo tumores estromales gastrointestinales, cáncer del esófago, cáncer del estómago, cáncer del hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer anal, tumores cerebrales incluyendo gliomas, linfomas incluyendo linfoma folicular y linfoma de célula B grande difuso, y cánceres ginecológicos incluyendo cánceres de ovarios, cervicouterino, y endometrial.

- 5 37. Un método de la modalidad 36, en donde el cáncer es cáncer de mama, linfoma, neuroblastoma, cáncer gástrico, o cáncer pancreático.

10 38. Un método de la modalidad 35, en donde el inhibidor de HSP90 radioetiquetado es una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 a administrarse como terapia.

15 39. Un método de la modalidad 36, en donde el inhibidor de HSP90 a administrarse como terapia es PU-H71 o un análogo, homólogo, o derivado de PU-H71.

20 40. Un método de la modalidad 35, en donde el inhibidor de HSP90 radioetiquetado es una forma radioetiquetada de PU-H71.

25 41. Un método de la modalidad 40, en donde la forma radioetiquetada de PU-H71 es [¹²⁴I]-PU-H71.

30 42. Un método para determinar si un paciente con cáncer con un tumor que se visualiza en imágenes probablemente responderá a la terapia con una dosis predeterminada de un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

35 (a) administrar al paciente una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 que se enlaza preferiblemente a una forma específica de tumor de HSP90 presente en el tumor o en células tumorales del tumor;

40 (b) medir la absorción de la forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 por el tumor del paciente en una pluralidad de puntos de tiempo después de la administración en la etapa (a);

45 (c) calcular para la dosis predeterminada del inhibidor de HSP90, las concentraciones del inhibidor de HSP90 que estarían presentes en el tumor del paciente en cada una de tal pluralidad de puntos de tiempo, con base en la absorción medida en tal pluralidad de puntos de tiempo en la etapa (b); y

50 (d) comparar las concentraciones del inhibidor de HSP90 calculadas en la etapa (c) con referencia a concentraciones del inhibidor de HSP90 que necesitarían estar presentes en el tumor en tal pluralidad de puntos de tiempo para que el inhibidor de HSP90 sea efectivo en el tratamiento del tumor

55 en donde el paciente probablemente responderá a la terapia con la dosis predeterminada del inhibidor de HSP90 si las concentraciones del inhibidor de HSP90 calculadas en la etapa (c) igualarían o excederían las concentraciones del inhibidor de HSP90 necesarias para tratar efectivamente el tumor y no serían tóxicas para el paciente.

60 43. Un método de la modalidad 40, en donde el tumor está asociado con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, carcinoma de célula basal, melanoma, carcinoma de célula renal, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, un cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de célula pequeña y cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, neuroblastoma, cánceres gastrointestinales incluyendo tumores estromales gastrointestinales, cáncer del esófago, cáncer del estómago, cáncer del hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer anal, tumores cerebrales incluyendo gliomas, linfomas incluyendo linfoma folicular y linfoma de célula B grande difuso, y cánceres ginecológicos incluyendo cánceres de ovarios, cervicouterino, y endometrial.

65 44. Un método de la modalidad 43, en donde el cáncer es cáncer de mama, linfoma, neuroblastoma, cáncer gástrico, o cáncer pancreático.

70 45. Un método de la modalidad 42, en donde el inhibidor de HSP90 a administrarse como terapia es PU-H71 o un análogo, homólogo, o derivado de PU-H71.

75 46. Un método de la modalidad 42, en donde el inhibidor de HSP90 radioetiquetado es una forma radioetiquetada de PU-H71.

80 47. Un método de la modalidad 46, en donde la forma radioetiquetada de PU-H71 es [¹²⁴I]-PU-H71.

85 48. Un método para determinar, para un paciente con cáncer específico con un tumor que se visualiza en imágenes, una dosis y frecuencia de administración efectivas para la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende las siguientes etapas:

90 (a) administrar al paciente una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 que se enlaza preferiblemente a una forma específica de tumor de HSP90 presente en un tumor o células tumorales:

- (b) medir la absorción de la forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 por el tumor del paciente en una pluralidad de puntos de tiempo después de la administración en la etapa (a); y
- (c) calcular la dosis y frecuencia de administración necesarias para mantener en el tumor en cada una de tal pluralidad de puntos de tiempo una concentración del inhibidor de HSP efectiva para tratar el tumor, con base en la absorción medida en tales puntos de tiempo en la etapa (b), determinando por ello, para el paciente con cáncer, la dosis y frecuencia de administración efectivas para la terapia con el inhibidor de HSP90.
- 5 49. Un método de la modalidad 48, en donde el tumor está asociado con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, carcinoma de célula basal, melanoma, carcinoma de célula renal, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, un cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de célula pequeña y cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, neuroblastoma, cánceres gastrointestinales incluyendo tumores estromales gastrointestinales, cáncer del esófago, cáncer del estómago, cáncer del hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer anal, tumores cerebrales incluyendo gliomas, linfomas incluyendo linfoma folicular y linfoma de célula B grande difuso, y cánceres ginecológicos incluyendo cánceres de ovarios, cervicouterino, y endometrial.
- 10 50. Un método de la modalidad 49, en donde el cáncer es cáncer de mama, linfoma, neuroblastoma, cáncer gástrico, o cáncer pancreático.
- 15 51. Un método de la modalidad 48, en donde el inhibidor de HSP90 radioetiquetado es una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 a administrarse como terapia.
- 20 52. Un método de la modalidad 48, en donde el inhibidor de HSP90 a administrarse como terapia es PU-H71 o un análogo, homólogo, o derivado de PU-H71.
53. Un método de la modalidad 48, en donde el inhibidor de HSP90 radioetiquetado es una forma radioetiquetada de PU-H71.
- 25 54. Un método de la modalidad 53, en donde la forma radioetiquetada de PU-H71 es [¹²⁴I]-PU-H71.
55. Un método para determinar la concentración de un inhibidor de HSP90 presente en un tumor que se visualiza en imágenes en un paciente con cáncer que comprende las siguientes etapas:
- (a) coadministrar al paciente una cantidad predeterminada del inhibidor de HSP90 y una cantidad predeterminada de una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 que se enlaza preferiblemente a una forma específica de tumor de HSP90 presente en un tumor o células tumorales;
- 30 (b) medir periódicamente la absorción del inhibidor de HSP90 radioetiquetado por el tumor del paciente en uno o más puntos de tiempo predefinidos después de la coadministración en la etapa (a); y
- (c) determinar la concentración del inhibidor de HSP90 presente en el tumor en cualquiera de tales puntos de tiempo con base en las mediciones de la absorción del inhibidor de HSP90 radioetiquetado en la etapa (b).
- 35 56. Un método de la modalidad 54, en donde el tumor está asociado con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, carcinoma de célula basal, melanoma, carcinoma de célula renal, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, un cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de célula pequeña y cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, neuroblastoma, cánceres gastrointestinales incluyendo tumores estromales gastrointestinales, cáncer del esófago, cáncer del estómago, cáncer del hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer anal, tumores cerebrales incluyendo gliomas, linfomas incluyendo linfoma folicular y linfoma de célula B grande difuso, y cánceres ginecológicos incluyendo cánceres de ovarios, cervicouterino, y endometrial.
- 40 57. Un método de la modalidad 56, en donde el cáncer es cáncer de mama, linfoma, neuroblastoma, cáncer gástrico, o cáncer pancreático.
- 45 58. Un método de la modalidad 55, en donde el inhibidor de HSP90 radioetiquetado es una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 a administrarse como terapia.
59. Un método de la modalidad 55, en donde el inhibidor de HSP90 a administrarse como terapia es PU-H71 o un análogo, homólogo, o derivado de PU-H71.
- 50 60. Un método de la modalidad 55, en donde el inhibidor de HSP90 radioetiquetado es una forma radioetiquetada de PU-H71.
61. Un método de la modalidad 60, en donde la forma radioetiquetada de PU-H71 es [¹²⁴I]-PU-H71.

62. Un método para determinar la capacidad de respuesta a la terapia con un inhibidor de HSP90 de un tumor que se visualiza en imágenes en un paciente con cáncer que comprende las siguientes etapas:

- (a) administrar una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 que se enlaza preferiblemente a una forma específica de tumor de HSP90 presente en un tumor o células tumorales, al paciente en múltiples puntos de tiempo dentro del periodo durante el cual el paciente recibe el inhibidor de HSP90 como terapia; y
- (b) medir la concentración del inhibidor de HSP90 radioetiquetado en el tumor del paciente en tales múltiples puntos de tiempo después de la administración en la etapa (a); y
- (c) comparar las concentraciones del inhibidor de HSP90 radioetiquetado medida en la etapa (b) con las concentraciones mínimas del inhibidor de HSP90 necesarias para tratar efectivamente el tumor, en donde las concentraciones medidas mayores que el mínimo necesario para tratar el tumor indican que el paciente probablemente responda a la terapia con el inhibidor de HSP90.

63. Un método de la modalidad 62, en donde el tumor está asociado con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, carcinoma de célula basal, melanoma, carcinoma de célula renal, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, un cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de célula pequeña y cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, neuroblastoma, cánceres gastrointestinales incluyendo tumores estromales gastrointestinales, cáncer del esófago, cáncer del estómago, cáncer del hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer anal, tumores cerebrales incluyendo gliomas, linfomas incluyendo linfoma folicular y linfoma de célula B grande difuso, y cánceres ginecológicos incluyendo cánceres de ovarios, cervicouterino, y endometrial.

64. Un método de la modalidad 63, en donde el cáncer es cáncer de mama, linfoma, neuroblastoma, cáncer gástrico, o cáncer pancreático.

65. Un método de la modalidad 62, en donde el inhibidor de HSP90 radioetiquetado es una forma radioetiquetada del inhibidor de HSP90 a administrarse como terapia.

66. Un método de la modalidad 62, en donde el inhibidor de HSP90 a administrarse como terapia es PU-H71 o un análogo, homólogo, o derivado de PU-H71.

67. Un método de la modalidad 62, en donde el inhibidor de HSP90 radioetiquetado es una forma radioetiquetada de PU-H71.

68. Un método de la modalidad 67, en donde la forma radioetiquetada de PU-H71 es [¹²⁴I]-PU-H71.

69. Un método para determinar si un cáncer humano presente en un paciente probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90 que comprende:

- (a) obtener una muestra que contiene células del cáncer del paciente, cuyas células expresan la proteína HSP90 sola o junto con la proteína HSP70;
- (b) evaluar en las células presentes en la muestra obtenida en la etapa (a) la presencia de al menos uno de los siguientes parámetros: una vía AKT activada, un defecto en la función o expresión supresora del tumor PTEN, una vía STAT5 activada, o expresión de proteína Bcl-xL; y
- (c) comparar la evaluación obtenida en la etapa (b) con una evaluación de referencia predeterminada del mismo parámetro o parámetros evaluados en la etapa (b) para células cancerosas humano de uno o más pacientes con cáncer quienes responden a la terapia con el inhibidor de HSP90 de manera que por ello se determine si el cáncer del paciente probablemente responderá a la terapia con el inhibidor de HSP90.

70. Un método de la modalidad 69, en donde el cáncer humano es cáncer de mama.

71. Un método de la modalidad 69, en donde las células cancerosas están asociadas con leucemia mieloide aguda.

8. REFERENCIAS

1. Whitesell, L.; Lindquist, S. L., HSP90 and the chaperoning of cancer. Nat. Rev. Cancer **2005**, 5, 761-772.
2. Workman, P.; Burrows, F.; Neckers, L.; Rosen, N., Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. Ann. N.Y. Acad. Sci. **2007**, 1113, 202–216.
3. Luo, W.; Sun, W.; Taldone, T.; Rodina, A.; Chiosis, G., Heat shock protein 90 in neurodegenerative diseases. Mol. Neurodegener. **2010**, 5:24.
4. Taldone, T.; Gozman, A.; Maharaj, R.; Chiosis, G., Targeting HSP90: small-molecule inhibitors and their clinical

- development. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, 8, 370-374.
5. Janin, Y. L., ATPase inhibitors of heat-shock protein 90, segunda temporada. *Drug Discovery Today* **2010**, 15, 342-353.
6. Kamal, A.; Thao, L.; Sensintaffar, J.; Zhang, L.; Boehm, M. F.; Fritz, L. C.; Burrows, F. J., A high-affinity conformation of HSP90 confers tumour selectivity on HSP90 inhibitors. *Nature* **2003**, 425, 407-410.
- 5 7. Dickey, C. A.; Kamal, A.; Lundgren, K.; Klosak, N.; Bailey, R. M.; Dunmore, J.; Ash, P.; Shoraka, S.; Zlatkovic, J.; Eckman, C. B.; Patterson, C.; Dickson, D. W.; Nahman, N. S.; Hutton, M.; Burrows, F.; Petrucelli, L., The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *J. Clin. Invest.* **2007**, 117, 648-658.
- 10 8. Chiosis, G.; Neckers, L., Tumor selectivity of HSP90 inhibitors: the explanation remains elusive. *ACS Chem. Biol.* **2006**, 1, 279-284.
9. Peters, J. M.; Ansari, M. Q., Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2011**, 135, 44-54.
- 10 10. Covey, T. M.; Cesano, A., Modulated multiparametric phosphoflow cytometry in hematological malignancies: technology and clinical applications. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **2010**, 23, 319-331.
- 15 11. Jennings, C. D.; Foon, K. A., Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* **1997**, 90, 2863-2892.
12. Leopoldo, M.; Lacivita, E.; Berardi, F.; Perrone, R., Developments in fluorescent probes for receptor research. *Drug Discov. Today* **2009**, 14, 706-712.
- 20 13. Llauger-Bufi, L.; Felts, S. J.; Huezo, H.; Rosen, N.; Chiosis, G., Synthesis of novel fluorescent probes for the molecular chaperone HSP90. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3975-3978.
14. Moulick, K.; Clement, C. C.; Aguirre, J.; Kim, J.; Kang, Y.; Felts, S.; Chiosis, G., Synthesis of a red-shifted fluorescence polarization probe for HSP90. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4515-4518.
- 25 15. Howes, R.; Barril, X.; Dymock, B. W.; Grant, K.; Northfield, C. J.; Robertson, A. G.; Surgenor, A.; Wayne, J.; Wright, L.; James, K.; Matthews, T.; Cheung, K. M.; McDonald, E.; Workman, P.; Drysdale, M. J., A fluorescence polarization assay for inhibitors of HSP90. *Anal. Biochem.* **2006**, 350, 202-213.
16. Tsutsumi, S.; Scroggins, B.; Koga, F.; Lee, M. J.; Trepel, J.; Felts, S.; Carreras, C.; Neckers, L., A small molecule cell-impermeant HSP90 antagonist inhibits tumor cell motility and invasion. *Oncogene* **2008**, 27, 2478-2487.
- 30 17. Taldone, T.; Chiosis, G., Purine-scaffold HSP90 inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, 9, 1436-1446.
18. Patel, H. J.; Modi, S.; Chiosis, G.; Taldone, T., Advances in the discovery and development of heat-shock protein 90 inhibitors for cancer treatment. *Expert Opin. Drug Discov.* 15 Mar 2011 (doi: 10.1517/17460441.2011.563296).
- 35 19. Papac, D. I.; Patton, J. S.; Reeves, L.; Bulka, K.; DeMie, L.; Roman, O.; Bradford, C.; Kim, S.-H.; Tangallapally, R.; Trovato, R.; Markowitz, B.; Bajji, A.; Wettstein, D.; Baichwal, V.; Mather, G., Comparative in vitro and in vivo metabolism of MPC-3100, an oral HSP90 inhibitor, in rat, dog, monkey and human. 102^a reunión anual de AACR, número de resumen 3233. Orlando, FL, 2-6 abril 2011.
20. Immormino, R. M.; Kang, Y.; Chiosis, G.; Gewirth, D. T., Structural and quantum chemical studies of 8-aryl-sulfanyl adenine class HSP90 inhibitors. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 4953-4960.
- 35 21. Taldone, T.; Zatorska, D.; Patel, P. D.; Zong, H.; Rodina, A.; Ahn, J. H.; Moulick, K.; Guzman, M. L.; Chiosis, G., Design, Synthesis and Evaluation of Small Molecule HSP90 Probes. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 2603-2614.
- 40 22. Taliani, S.; Simorini, F.; Sergianni, V.; La Motta, C.; Da Settimo, F.; Cosimelli, B.; Abignente, E.; Greco, G.; Novellino, E.; Rossi, L.; Gremigni, V.; Spinetti, F.; Chelli, B.; Martini, C., New fluorescent 2-phenylindolglyoxylamide derivatives as probes targeting the peripheral-type benzodiazepine receptor: design, synthesis, and biological evaluation. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 404-407.
- 45 23. He, H.; Zatorska, D.; Kim, J.; Aguirre, J.; Llauger, L.; She, Y.; Wu, N.; Immormino, R. M.; Gewirth, D. T.; Chiosis, G., Identification of potent water soluble purine-scaffold inhibitors of the heat shock protein 90. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 381-390.
24. Vial, J. P.; Lacombe, F., Immunophenotyping of acute leukemia: utility of CD45 for blast cell identification. *Methods Cell Biol.* **2001**, 64, 343-358.
25. Ley, T.J. et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome *Nature* **456**, 66-72

(2008).

26. Parsons, D.W. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807-1812 (2008).
- 5 27. Hanash, S. & Taguchi, A. The grand challenge to decipher the cancer proteome. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 652-660 (2010).
28. Kolch, W. & Pitt, A. Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signalling pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 618-629 (2010).
29. Nomura, D.K., Dix, M.M. & Cravatt, B.F. Activity-based protein profiling for biochemical pathway discovery in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 630-638 (2010).
- 10 30. Brehme, M. et al. Charting the molecular network of the drug target Bcr-Abl. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 7414-7419 (2009).
31. Ashman, K. & Villar, E.L. Phosphoproteomics and cancer research. *Clin. Transl. Oncol.* **11**, 356-362 (2009).
32. Zuehlke, A. & Johnson, J.L. HSP90 and cochaperonins twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers* **93**, 211-217 (2010).
- 15 33. Workman, P., Burrows, F., Neckers, L. & Rosen, N. Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1113**, 202-216 (2007).
34. Kamal, A. et al. A high-affinity conformation of HSP90 confers tumour selectivity on HSP90 inhibitors, *Nature* **425**, 407-410 (2003).
35. Janin, Y.L. ATPase inhibitors of heat-shock protein 90, second season. *Drug Discov. Today* **15**, 342-353 (2010).
- 20 36. Tsaytler, P.A., Krijgsveld, J., Goerdayal, S.S., Rüdiger, S. & Egmond, M.R. Novel HSP90 partners discovered using complementary proteomic approaches. *Cell Stress Chaperon* **14**, 629-638 (2009).
37. da Rocha Dias, S. et al. Activated B-Raf is an HSP90 client protein that is targeted by the anticancer drug 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res.* **65**, 10686-10691 (2005).
- 25 38. Grbovic, O.M. et al. V600E B-Raf requires the HSP90 chaperone for stability and is degraded in response to HSP90 inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 57-62 (2006).
39. Taldone, T. & Chiosis, G. Purine-scaffold HSP90 inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 1436-1446 (2009).
40. Dezwaan, D.C. & Freeman, B.C. HSP90: the Rosetta stone for cellular protein dynamics? *Cell Cycle* **7**, 1006-1012 (2008).
- 30 41. Ren, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 172-183 (2005).
42. Burke, B.A. & Carroll, M. BCR-ABL: a multi-faceted promoter of DNA mutation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* **24**, 1105-1112 (2010).
43. McClellan, A.J. et al. Diverse cellular functions of the HSP90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* **131**, 121-135 (2007).
- 35 44. Carayol, N. et al. Critical roles for mTORC2- and rapamycin-insensitive mTORC1-complexes in growth and survival of BCR-ABL-expressing leukemic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 12469-12474 (2010).
45. Nobukuni, T., Kozma, S.C. & Thomas, G. hvp34, an ancient player, enters a growing game: mTOR Complex1/S6K1 signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 135-141 (2007).
46. McCubrey, J.A. et al. Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy. *Leukemia* **22**, 708-722 (2008).
- 40 47. Häcker, H. & Karin, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci. STKE*. 2006(357):re13.
48. Mihailovic, T. et al. Protein kinase D2 mediates activation of nuclear factor kappaB by Bcr-Abl in Bcr-Abl+ human myeloid leukemia cells. *Cancer Res.* **64**, 8939-8944 (2004).
49. Hendriks, R.W. & Kersseboom, R. Involvement of SLP-65 and Btk in tumor suppression and malignant transformation of pre-B cells. *Semin. Immunol.* **18**, 67-76 (2006).

50. Mahajan, S. et al. Transcription factor STAT5A is a substrate of Bruton's tyrosine kinase in B cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 31216-31228 (2001).
51. Oda, A., Wakao, H. & Fujita, H. Calpain is a signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 and STAT5 protease. *Blood* **99**, 1850-1852 (2002).
- 5 52. Si, J. & Collins, S.J. Activated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IIgamma is a critical regulator of myeloid leukemia cell proliferation. *Cancer Res.* **68**, 3733-3742 (2008).
- 10 53. Salgia, R. et al. Increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins in myeloid cell lines expressing p210BCR/ABL. *Oncogene* **11**, 1149-1155 (1995).
- 10 54. Le, Y. et al. FAK silencing inhibits leukemogenesis in BCR/ABL-transformed hematopoietic cells. *Am. J. Hematol.* **84**, 273-278 (2009).
- 15 55. Sawyers, C.L. The role of myc in transformation by Bcr-Abl. *Leuk. Lymphoma*. **11**, 45-46 (1993).
- 15 56. Naka, K. et al. TGF-beta-FOXO signaling maintains leukemia-initiating cells in chronic myeloid leukemia. *Nature* **463**, 676-678 (2010).
- 15 57. Bedford, M.T. & Clarke, S.G. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol. Cell* **33**, 1-13 (2009).
- 20 58. Maloney, A. et al. Gene and protein expression profiling of human ovarian cancer cells treated with the heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res.* **67**, 3239-3253 (2007).
- 20 59. Jaganathan, S., Yue, P. & Turkson, J. Enhanced sensitivity of pancreatic cancer cells to concurrent inhibition of aberrant signal transducer and activator of transcription 3 and epidermal growth factor receptor or Src. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **333**, 373-381 (2010).
- 25 60. Apsel, B., et al. Targeted polypharmacology: discovery of dual inhibitors of tyrosine and phosphoinositide kinases. *Nature Chem. Biol.* **4**, 691-699 (2008).
- 25 61. Deininger, M.W. & Druker, B.J. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol. Rev.* **55**, 401-423 (2003).
- 25 62. Katzav, S. Flesh and blood: the story of Vav1, a gene that signals in hematopoietic cells but can be transforming in human malignancies. *Cancer Lett.* **255**, 241-254 (2007).
- 30 63. Pratt, W.B., Morishima, Y. & Osawa, Y. The HSP90 chaperone machinery regulates signaling by modulating ligand binding clefts. *J. Biol. Chem.* **283**, 22885-22889 (2008).
- 30 64. de Groot, R.P., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Jove, R. & Koenderman, L. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* **94**, 1108-1112 (1999).
- 35 65. An, W.G., Schulte, T.W. & Neckers, L.M. The heat shock protein 90 antagonist geldanamycin alters chaperone association with p210bcr-abl and v-src proteins before their degradation by the proteasome. *Cell Growth Differ.* **11**, 355-360 (2000).
- 35 66. Klejman, A. et al. The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *EMBO J.* **21**, 5766-5774 (2002).
- 35 67. Xu, D. & Qu, C.K. Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front. Biosci.* **13**, 4925-4932 (2008).
- 35 68. Lim, C.P. & Cao, X. Structure, function and regulation of STAT proteins. *Mol. BioSyst.* **2**, 536-550 (2006).
- 40 69. Paukku, K. & Silvennoinen, O. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 435-455 (2004).
- 40 70. Cerchietti, L.C. et al. A purine scaffold HSP90 inhibitor destabilizes BCL-6 and has specific antitumor activity in BCL-6-dependent B cell lymphomas. *Nat. Med.* **15**, 1369-1376 (2009).
- 45 71. Horn, T., Sandmann, T. & Boutros, M. Design and evaluation of genome-wide libraries for RNA interference screens. *Genome Biol.* **2010**;11(6):R61.
- 45 72. Rix, U. & Superti-Furga, G. Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 616-624 (2009).
- 45 73. Trinkle-Mulcahy, L. et al. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J. Cell. Biol.* **183**, 223-239 (2008).

74. Dierov, J., Dierova, R. & Carroll, M. BCR/ABL translocates to the nucleus and disrupts an ATR-dependent intra-S phase checkpoint. *Cancer Cell* **5**, 275-85 (2004).
75. Taldone, T. et al. Design, Synthesis and Evaluation of Small Molecule HSP90 Probes. Publ.ID: BMC9085 (2011).
- 5 76. Taldone, T. et al. Synthesis and Evaluation of Fluorescent HSP90 Probes for Use in Flow Cytometry. BMCL (2011).
77. He, H. et al. Identification of potent water soluble purine-scaffold inhibitors of the heat shock protein 90. *J. Med. Chem.* **49**, 381-390 (2006).
78. Winkler, G S. et al. Isolation and mass spectrometry of transcription factor complexes. *Methods* **26**, 260-269 (2002).
- 10 79. Erdjument-Bromage, H. et al. Micro-tip reversed-phase liquid chromatographic extraction of peptide pools for mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A* **826**, 167-181 (1998).
80. Trinkle-Mulcahy, L., et al. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J. Cell. Biol.* **183**, 223-239 (2008).
- 15 81. Munday, D. et al. Quantitative proteomic analysis of A549 cells infected with human respiratory syncytial virus. *Mol. Cell Proteomics* **9**, 2438-2459 (2010).
82. Andersen, J.N. et al. Pathway-Based Identification of Biomarkers for Targeted Therapeutics: Personalized Oncology with PI3K Pathway Inhibitors. *Sci. Transl. Med.* **2**, 43ra55 (2010).
83. Cerchietti, L.C. et al. A purine scaffold HSP90 inhibitor destabilizes BCL-6 and has specific antitumor activity in BCL-6-dependent B cell lymphomas. *Nat. Med.* **15**, 1369-1376 (2009)
- 20 84. Powers, M.V., Clarke, P.A., Workman, P. Dual targeting of Hsc70 and Hsp72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell* **14**, 250-262 (2008).
85. Fabian, M.A. et al. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* **23**, 329-336 (2005).
- 25 86. Moffat, J. et al. A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen. *Cell* **124**, 1283-1298 (2006).
87. Zhao, X. et al. Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev.* **22**, 640-653 (2009).
88. Chou, T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* **58**, 621-681 (2006).
- 30 89. Chou, T.C. & Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* **22**, 27-55 (1984).
90. Dierov, J., Dierova, R. & Carroll, M. BCR/ABL translocates to the nucleus and disrupts an ATR-dependent intra-S phase checkpoint. *Cancer Cell* **5**, 275-85 (2004).
- 35 91. Beliakoff, J. & Whitesell, L. HSP90: an emerging target for breast cancer therapy. *Anticancer Drugs*. **15**, 651-662 (2004).
92. Calderwood, S.K. Heat shock proteins in breast cancer progression--a suitable case for treatment? *Int. J. Hyperthermia* **26**, 681-685 (2010).
93. Pick, E. et al. High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res.* **67**, 2932-2937 (2007).
- 40 94. Stravopodis, D.J., Margaritis, L.H. & Voutsinas, G.E. Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the HSP90 chaperone complex. *Curr. Med. Chem.* **14**, 3122-3138 (2007).
95. Pashtan, I., Tsutsumi, S., Wang, S., Xu, W. & Neckers, L. Targeting HSP90 prevents escape of breast cancer cells from tyrosine kinase inhibition. *Cell Cycle* **7**, 2936-2941 (2008).
- 45 96. Citri, A., Kochupurakkal, B.S. & Yarden, Y. The achilles heel of ErbB-2/HER2: regulation by the HSP90 chaperone machine and potential for pharmacological intervention. *Cell Cycle* **3**, 51-60 (2004).
97. Workman, P., Burrows, F., Neckers, L. & Rosen, N. Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1113**, 202-216 (2007).

98. Modi, S., et al. Combination of trastuzumab and tanespimycin (17-AAG, KOS- 953) is safe and active in trastuzumab-refractory HER-2 overexpressing breast cancer: a phase I dose-escalation study. *J. Clin. Oncol.* **25**, 5410–5417 (2007).
- 5 99. Murphy, C.G. & Fornier, M. HER2-positive breast cancer: beyond trastuzumab. *Oncology (Williston Park)* **24**, 410–415 (2010).
100. Caldas-Lopes, M.E., et al. Heat shock protein 90 inhibitor PU-H71, a multimodal inhibitor of malignancy, induces complete responses in triple-negative breast cancer models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 8368–8373 (2009).
- 10 101. Tan, D.S., et al. Biomarker-driven early clinical trials in oncology: a paradigm shift in drug development. *Cancer J.* **15**, 406–420 (2009).
102. Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G. & Neckers, L. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 537–549 (2010).
103. Holland, J.P., et al. Measuring the Pharmacodynamic Effects of a Novel HSP90 Inhibitor on HER2/neu Expression in Mice Using 89Zr-DFO-Trastuzumab. *PLoS ONE* **5**(1): e8859 (2010).
- 15 104. Nagengast, W.B., et al. 89Zr-bevacizumab PET of early antiangiogenic tumor response to treatment with HSP90 inhibitor NVP-AUY922. *J. Nucl. Med.* **51**, 761–767 (2010).
105. Zhang, H., et al. Identification of new biomarkers for clinical trials of HSP90 inhibitors. *Mol. Cancer. Ther.* **5**, 1256–1264 (2006).
106. Vilenchik, M., et al. Targeting wide-range oncogenic transformation via PU24FCI, a specific inhibitor of tumor HSP90. *Chem. Biol.* **11**, 787–797 (2004).
- 20 107. Chandarlapaty, S., et al. SNX2112, a synthetic heat shock protein 90 inhibitor, has potent antitumor activity against HER kinase-dependent cancers. *Clin. Cancer Res.* **14**, 240–248 (2008).
108. Eccles, S.A., et al. NVP-AUY922: a novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res.* **68**, 2850–2860 (2008).
- 25 109. Patel, H., Modi, S., Chiosis, G. & Taldone, T. Advances in the discovery and development of HSP90 inhibitors for cancer treatment. *Expert Opin. Drug Discovery* **6**, 559–587 (2011).
110. Gambhir, S.S. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 683–693 (2002).
111. Mankoff, D.A. Molecular imaging to select cancer therapy and evaluate treatment response. *J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **53**, 181–192 (2009).
- 30 112. Visioni, A. & Kim, J. Positron emission tomography for benign and malignant disease. *Surg. Clin. North Am.* **91**, 249–266 (2011).
113. Pentlow, K.S., et al. Quantitative imaging of iodine-124 with PET. *J. Nucl. Med.* **37**, 1557–1562 (1996).
114. Taldone, T. & Chiosis, G. Purine-scaffold HSP90 inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 1436–1446 (2009).
- 35 115. Cerchietti, L.C., et al. A purine scaffold HSP90 inhibitor destabilizes BCL6 and has specific antitumoral activity in BCL6 dependent DLBCLs in vitro and in vivo. *Nat. Med.* **15**, 1369–1376 (2009).
116. Marubayashi, S., et al. HSP90 as a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms. *J. Clin. Invest.* **120**, 3578–3593 (2010).
117. Breinig, M., et al. Targeting the heat shock protein HSP90 with non-quinone inhibitors: A novel chemotherapeutic approach in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **50**, 102–112 (2009).
- 40 118. Rodina, A., et al. Selective compounds define HSP90 as a major inhibitor of apoptosis in small-cell lung cancer. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 498–507 (2007).
119. Li, Z.S., Schmauss, C., Cuenca, A., Ratcliffe, E. & Gershon, M.D. Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *J. Neurosci.* **26**, 2798–2807 (2006).
- 45 120. Zuckier, L.S., et al. Kinetics of perrhenate uptake and comparative biodistribution of perrhenate, pertechnetate, and iodide by Na⁺ symporter-expressing tissues in vivo. *J. Nucl. Med.* **45**, 500–507 (2004).
121. Lundh, C., Lindencrona, U., Schmitt, A., Nilsson, M. & Forssell-Aronsson, E. Biodistribution of free 211At and

- 125I- in nude mice bearing tumors derived from anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Biother. Radiopharm.* **21**, 591–600 (2006).
- 5 122. Chopra A. [N-11C-methyl]-[4-[(4-Methyl-1-piperazinyl)methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridyl)-2-pyrimidinyl]amino]phenyl]benzamide. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD) [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004–2010.
123. Rosso, L., et al. A new model for prediction of drug distribution in tumor and normal tissues: pharmacokinetics of temozolomide in glioma patients. *Cancer Res.* **69**, 120–127 (2009).
- 10 124. Saleem, A., Aboagye, E.O., Matthews, J.C. & Price, P.M. Plasma pharmacokinetic evaluation of cytotoxic agents radiolabelled with positron emitting radioisotopes. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **61**, 865–873 (2008).
125. Leung K. ¹⁸F-N-(2-Chloro-6-methylphenyl)-2-(6-(4-(2-fluoroethyl)piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD) [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004–2010.
- 15 126. Ginos, J.Z., et al. ^{[13}N]cisplatin PET to assess pharmacokinetics of intra-arterial versus intravenous chemotherapy for malignant brain tumors. *J. Nucl. Med.* **28**, 1844–1852 (1987).
127. Higgins, L.J. & Pomper, M.G. The evolution of imaging in cancer: current state and future challenges. *Semin. Oncol.* **38**, 3–15 (2011).
- 20 128. Marik, J. & Junutula, J.R. Emerging role of immunoPET in receptor targeted cancer therapy. *Curr. Drug Deliv.* **8**, 70–78 (2011).
129. Bhojani, M.S., Van Dort, M., Rehemtulla, A. & Ross, B.D. Targeted imaging and therapy of brain cancer using theranostic nanoparticles. *Mol. Pharm.* **7**, 1921–1929 (2010).
- 25 130. Yang, D.J., Kim, E.E. & Inoue T. Targeted molecular imaging in oncology. *Ann. Nucl. Med.* **20**, 1–11 (2006).
131. Workman, P., et al. Minimally invasive pharmacokinetic and pharmacodynamic technologies in hypothesis-testing clinical trials of innovative therapies. *J. Natl.Cancer Inst.* **98**, 580–598 (2006).
132. Pillarsetty, N., et al. Radiosynthesis of the iodine-124 labeled HSP90 inhibitor PUH71. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **xx**, (2011).
- 25 133. Taldone, T., Zatorska, D., Kang, Y. & Chiosis, G. A facile and efficient synthesis of d6-labeled PU-H71, a purine-scaffold HSP90 inhibitor. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **53**, 47–49 (2010).

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un paciente con un cáncer de la sangre probablemente responderá a la terapia con un inhibidor de HSP90, que comprende:

- 5 (a) poner en contacto una muestra que contiene células cancerosas y células no cancerosas del paciente con un PU-H71 fluorescentemente etiquetado permeable a las células que se enlaza preferiblemente a una forma de HSP90 específica de tumor presente en las células cancerosas del paciente;
- 10 (b) medir la cantidad de PU-H71 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas y células no cancerosas en la muestra; y
- 15 (c) comparar la cantidad del PU-H71 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas con la cantidad del PU-H71 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células no cancerosas,

en donde una cantidad mayor de PU-H71 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células cancerosas que a las células no cancerosas indica que el tumor probablemente responderá a un inhibidor de HSP90, preferiblemente donde las células no cancerosas son linfocitos, y más preferiblemente donde dicha medición se lleva a cabo mediante citometría de flujo.

2. El método de la reivindicación 1, donde cuanto mayor sea la relación de la cantidad de PU-H71 fluorescentemente etiquetado enlazado al tumor o a las células tumorales medida en la etapa (b) en comparación con el PU-H71 fluorescentemente etiquetado enlazado a las células no cancerosas, mayor será la magnitud de la respuesta posible a la terapia con inhibidor de HSP90.

20 **3.** El método de la reivindicación 1 o 2, donde el cáncer de sangre es una leucemia, preferiblemente es leucemia mieloide crónica.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la muestra comprende células vivas.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la muestra comprende un fluido biológico, preferiblemente sangre o médula ósea, más preferiblemente sangre.

25 **6.** El método de la reivindicación 1, donde la muestra comprende células tumorales alteradas.

7. El método de la reivindicación 1, donde la muestra comprende células congeladas.

8. El método de la reivindicación 1, donde la muestra comprende células fijadas y permeabilizadas.

9. El método de la reivindicación 1, donde el inhibidor de HSP90 que se administrará como terapia es PU-H71.

30 **10.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado es PU-H71-FITC2.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el inhibidor de HSP90 fluorescentemente etiquetado es PU-H71-NBD1.

12. El método de la reivindicación 1, donde el cáncer de sangre es una malignidad hematológica.

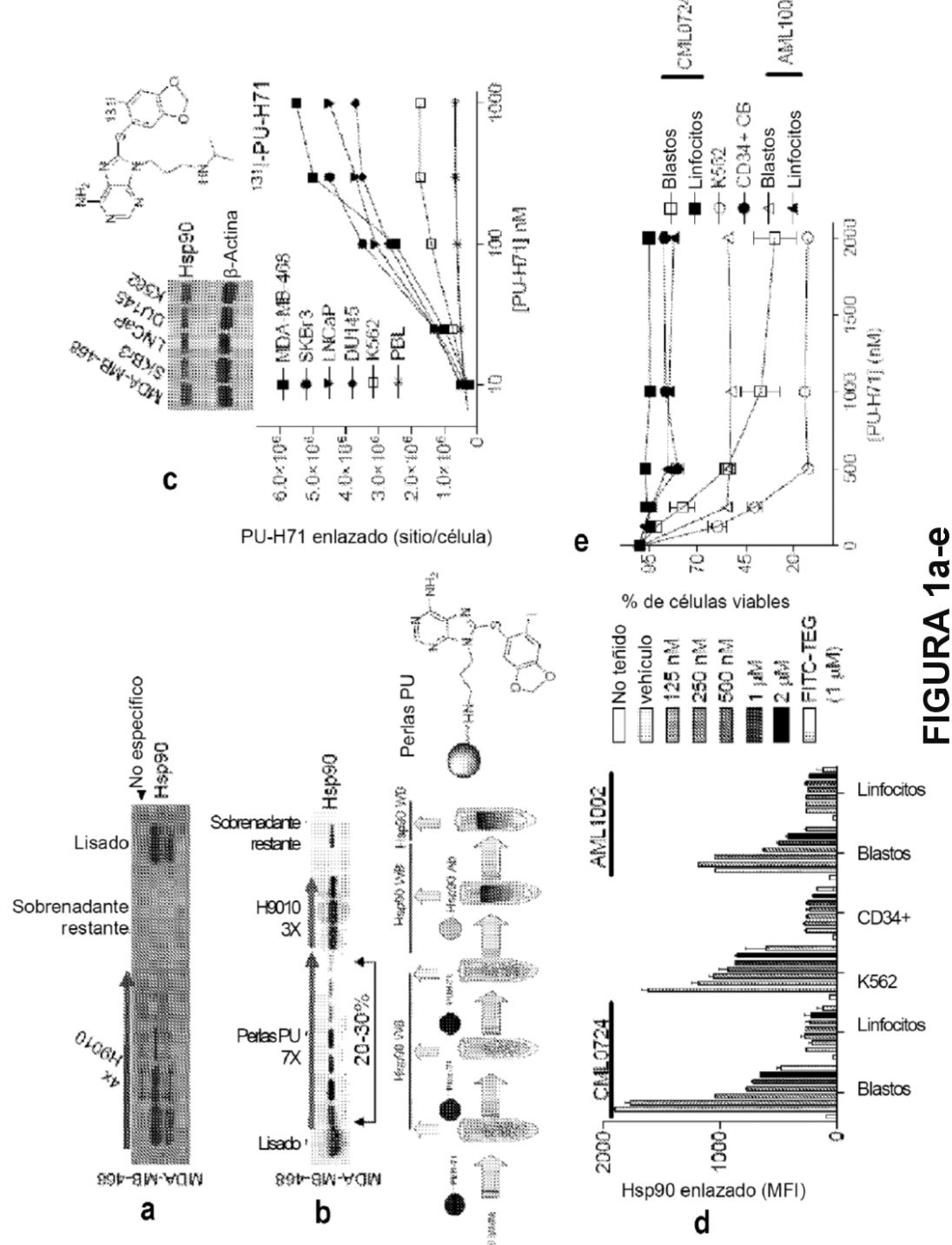
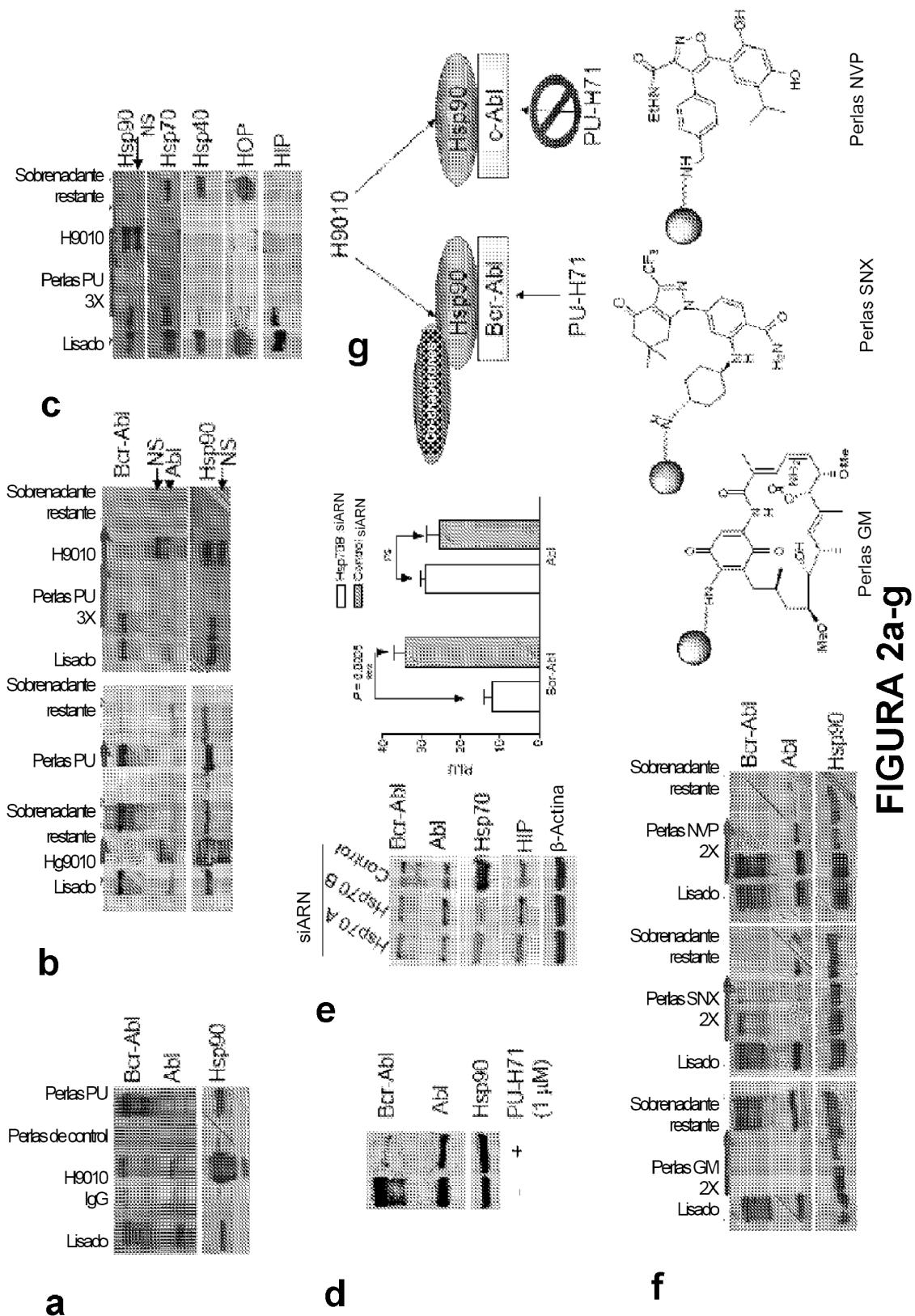
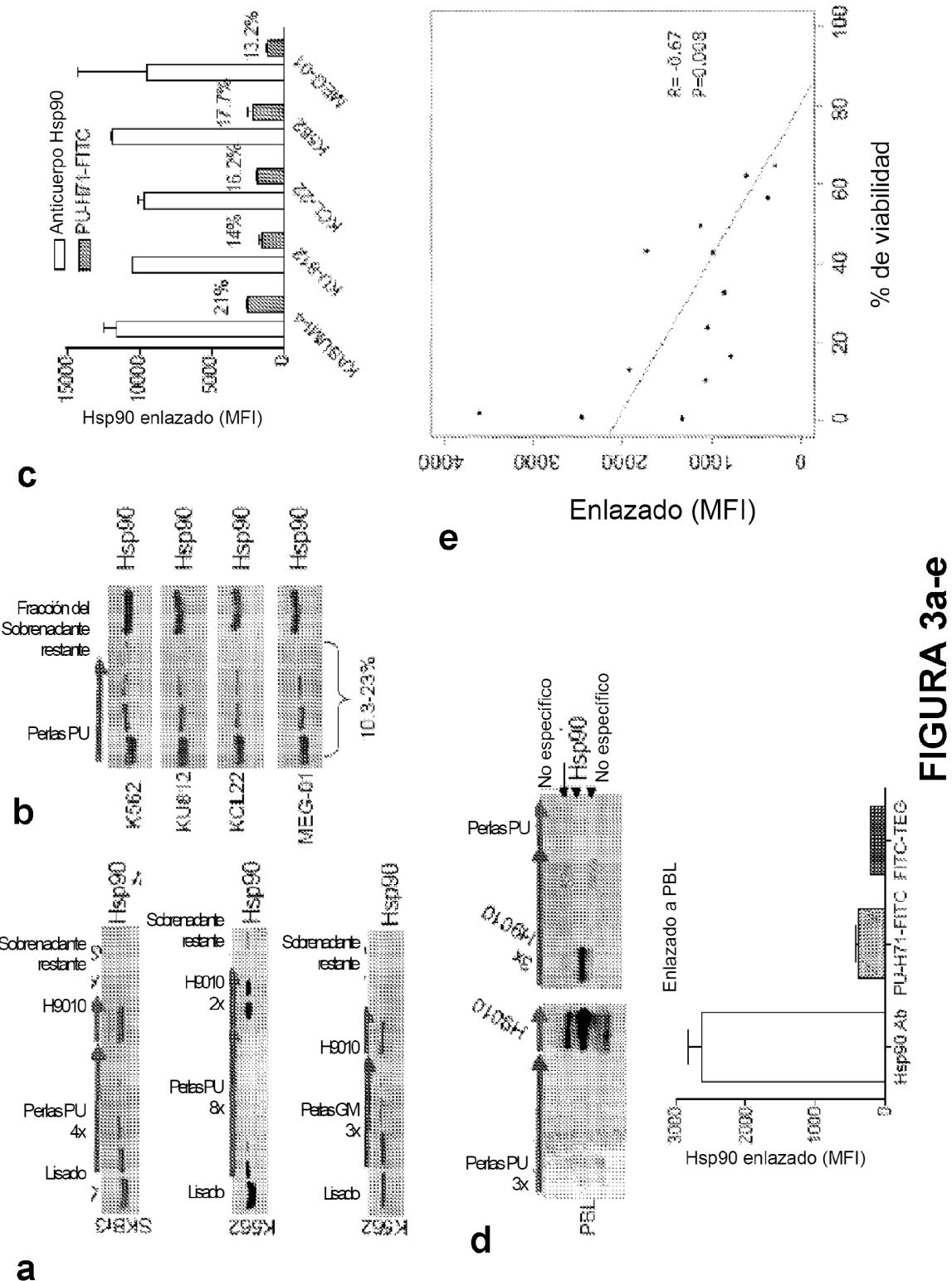


FIGURA 1a-e

**FIGURA 2a-g**

**FIGURA 3a-e**

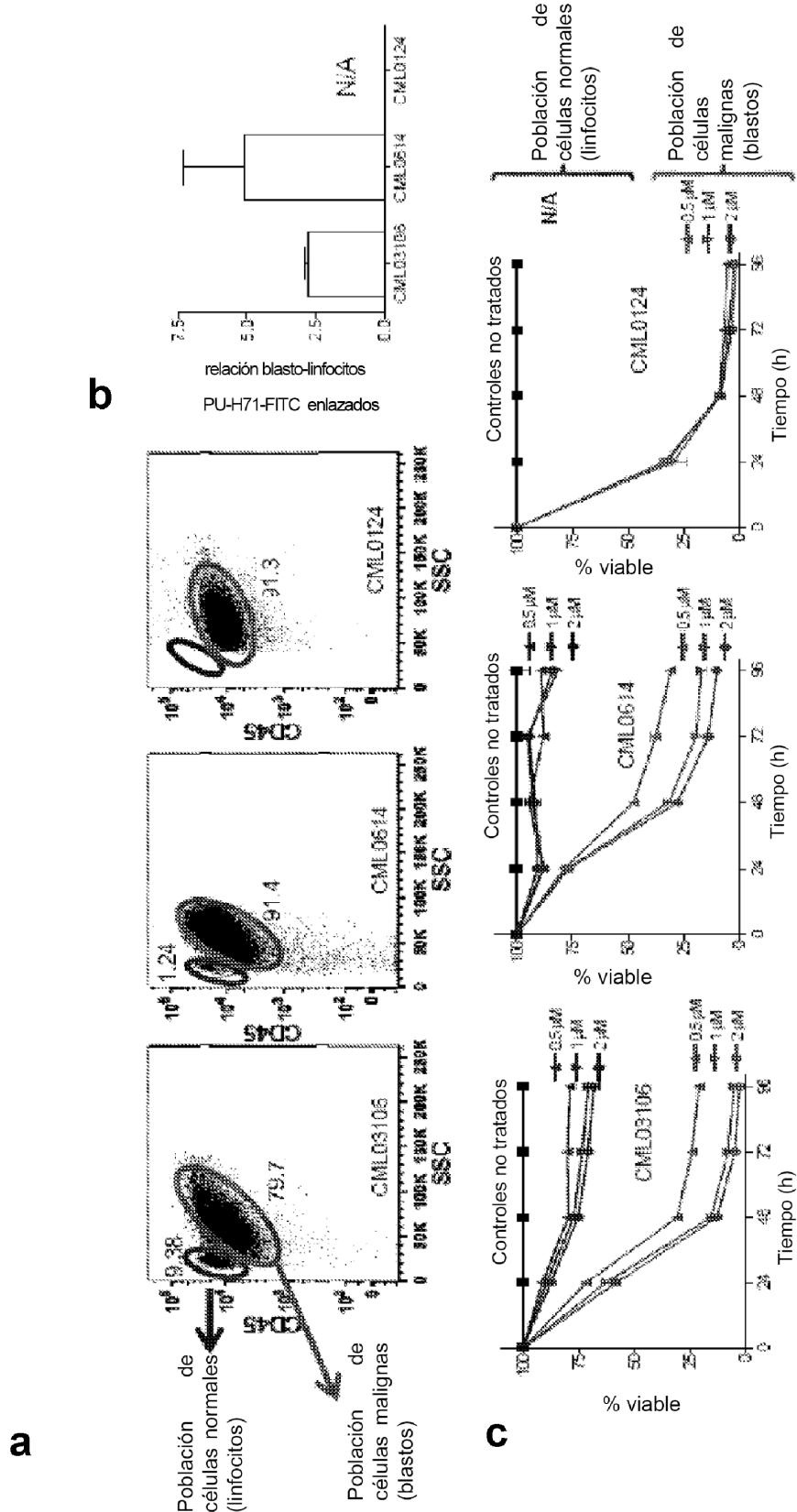
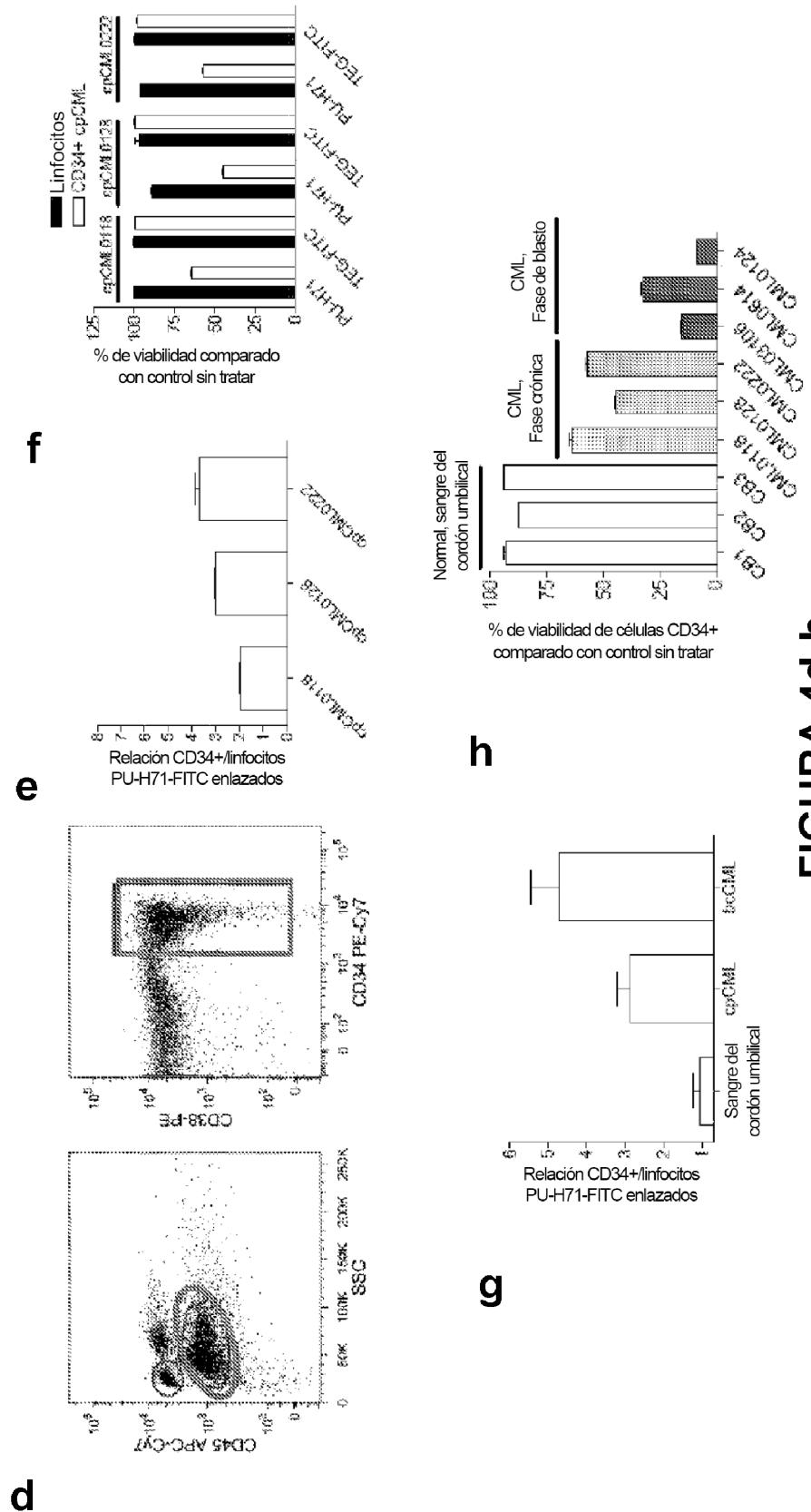
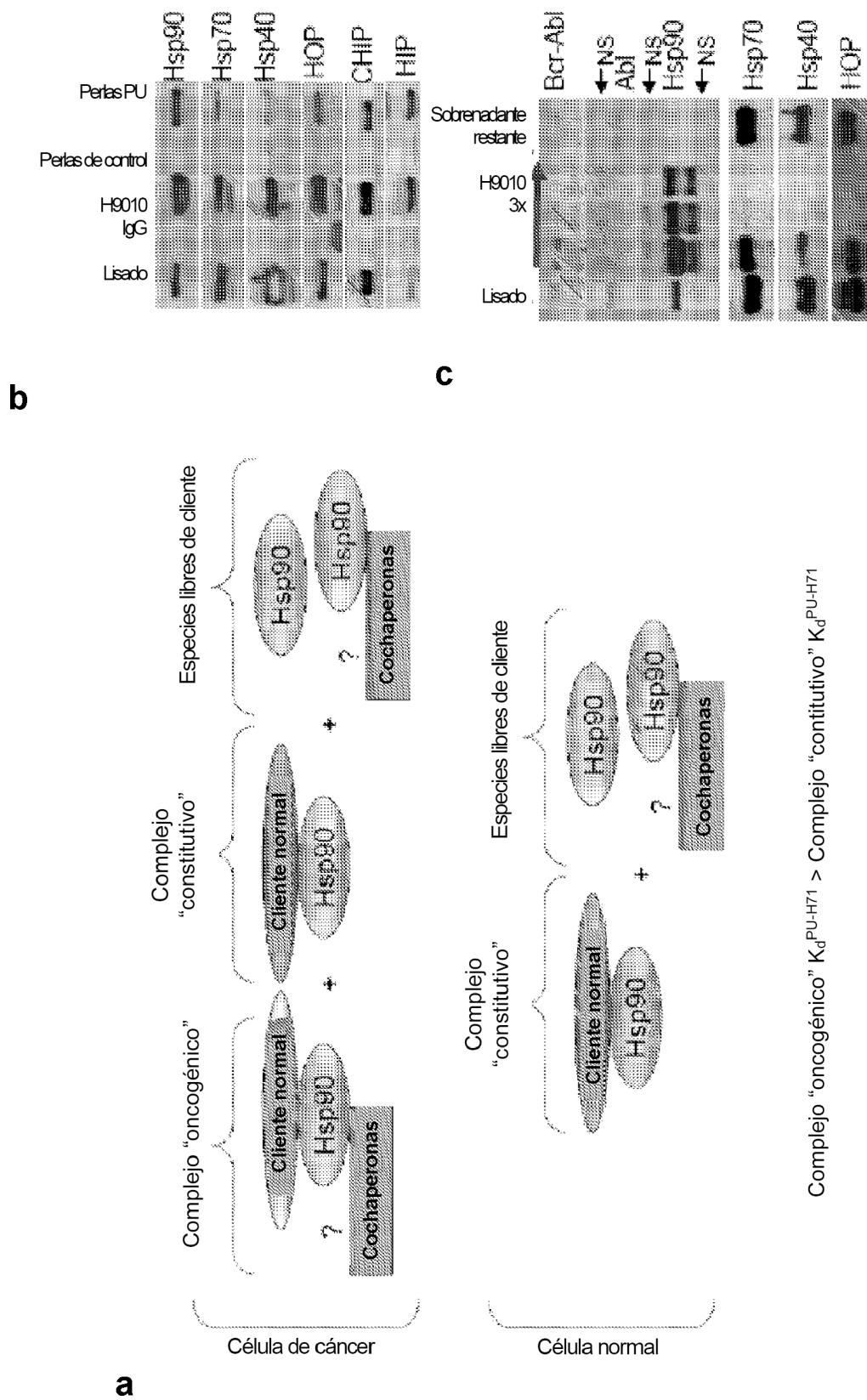
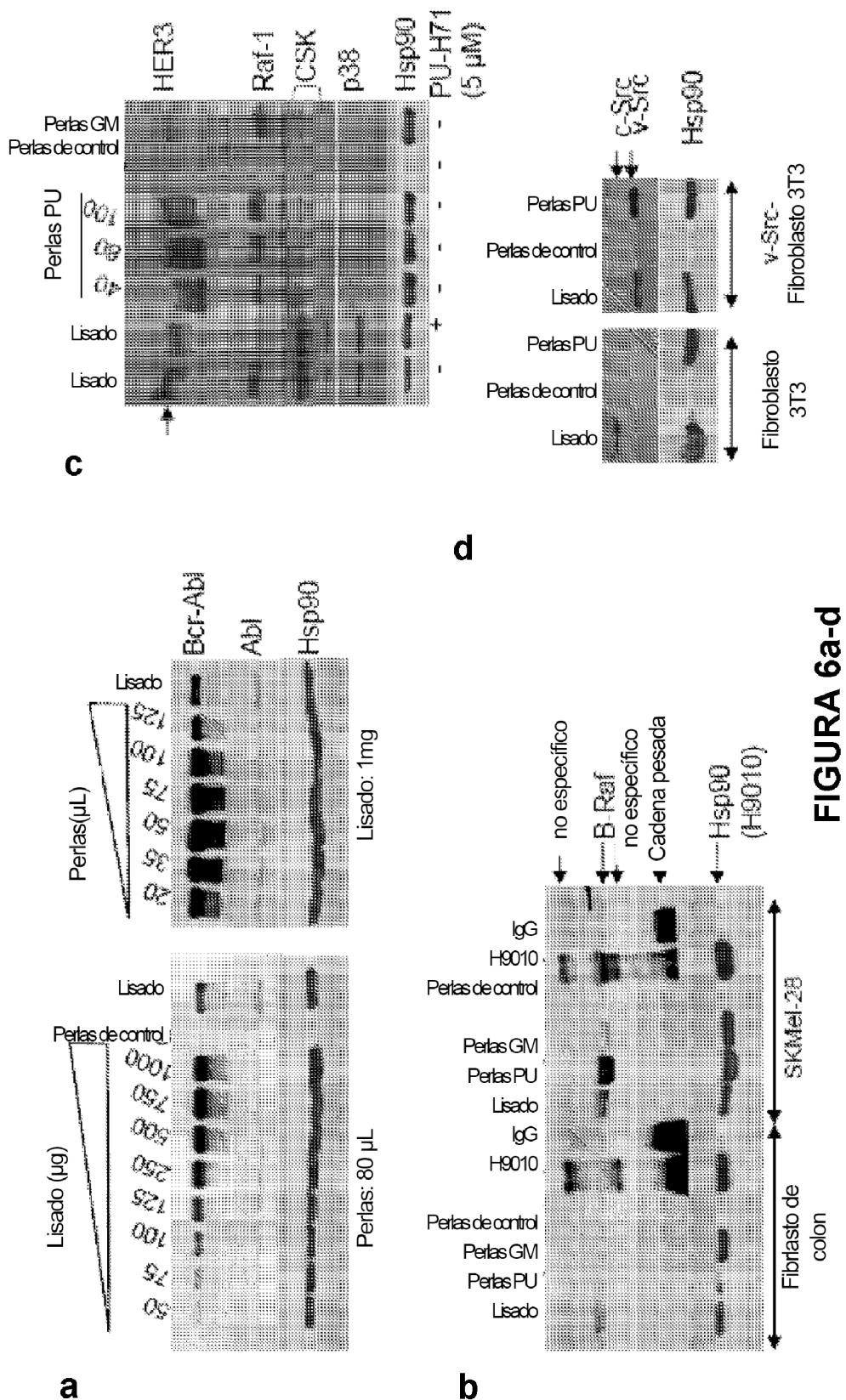


FIGURA 4a-c

**FIGURA 4d-h**

**FIGURA 5a-c**

**FIGURA 6a-d**

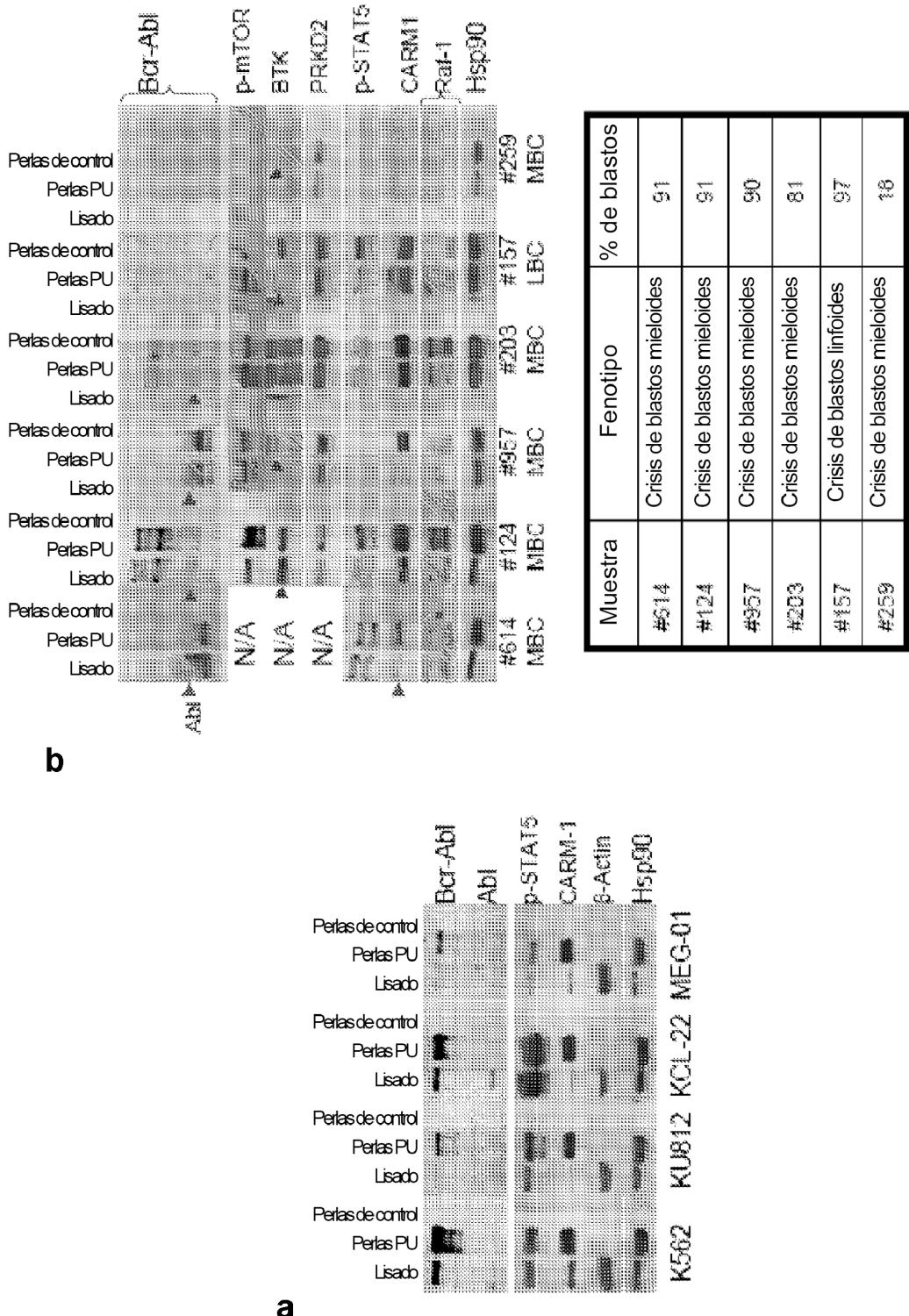
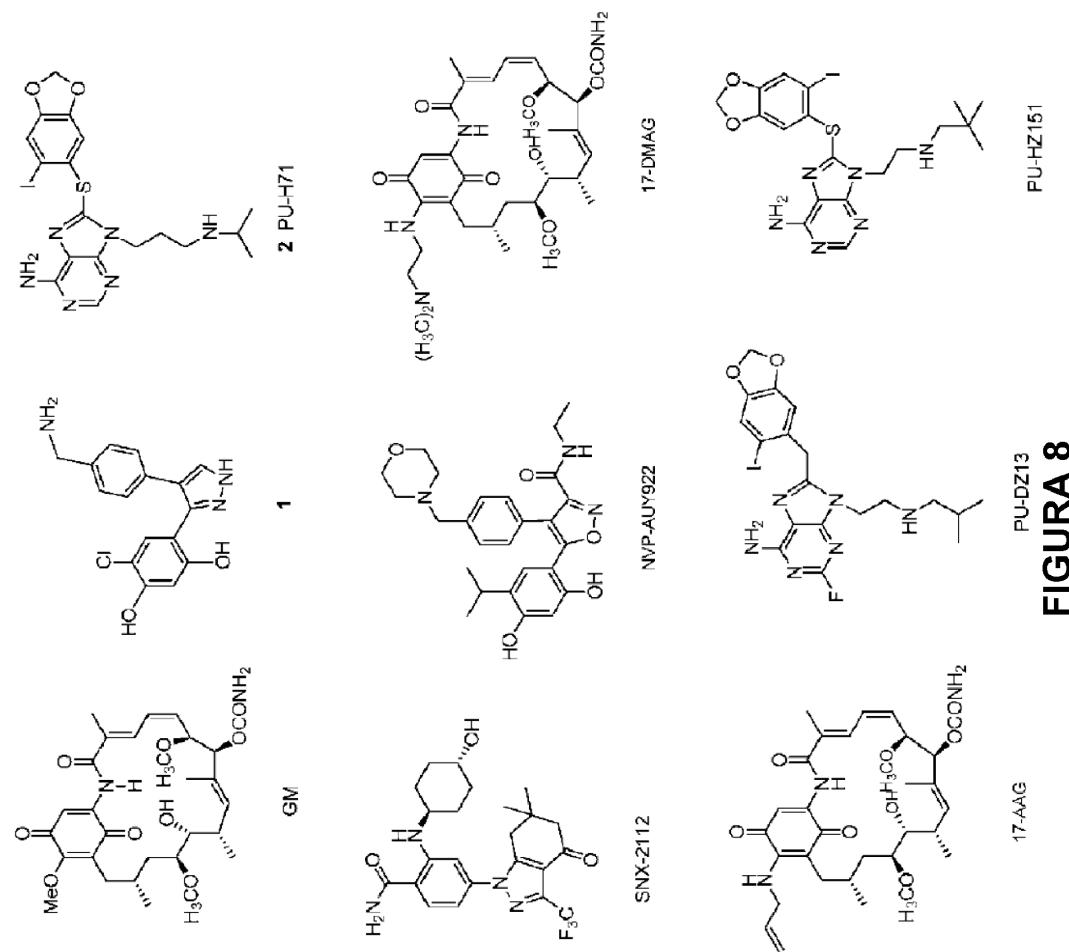
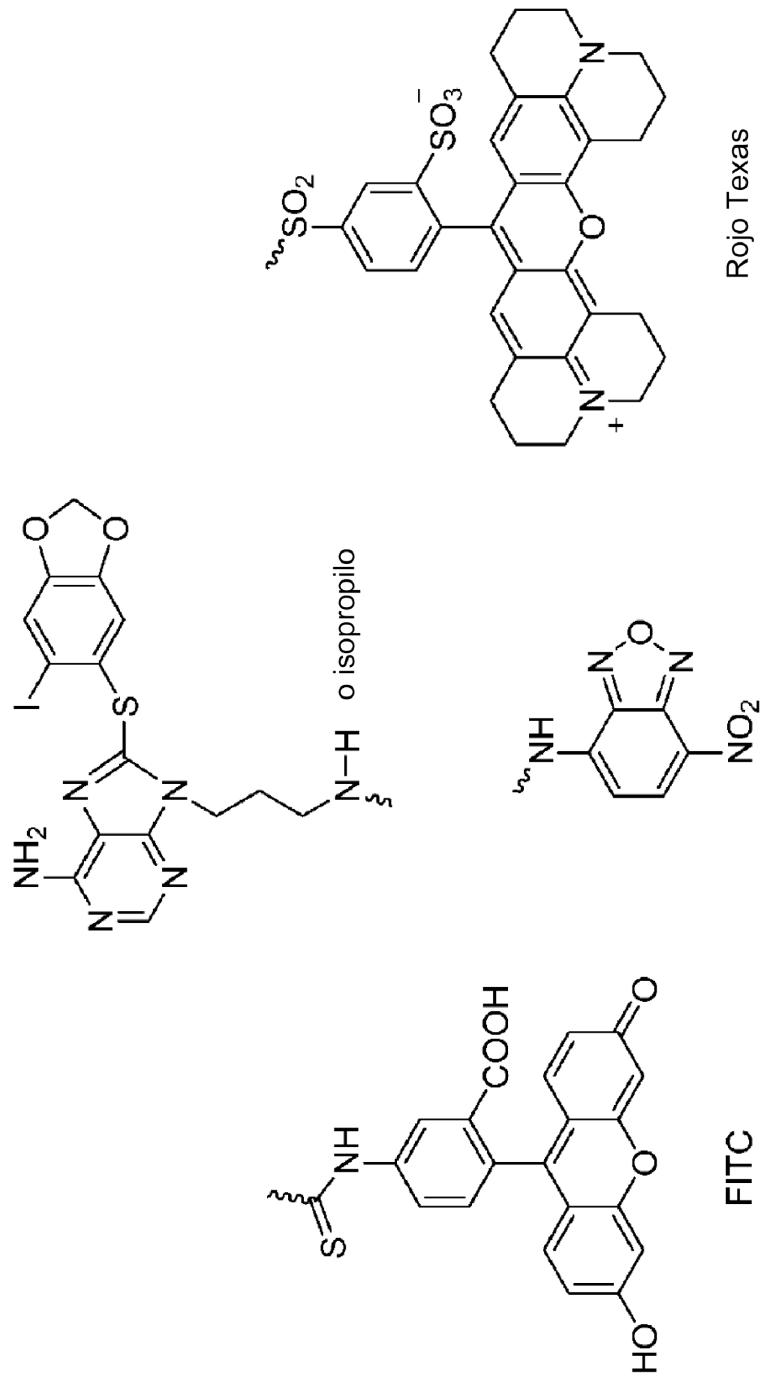
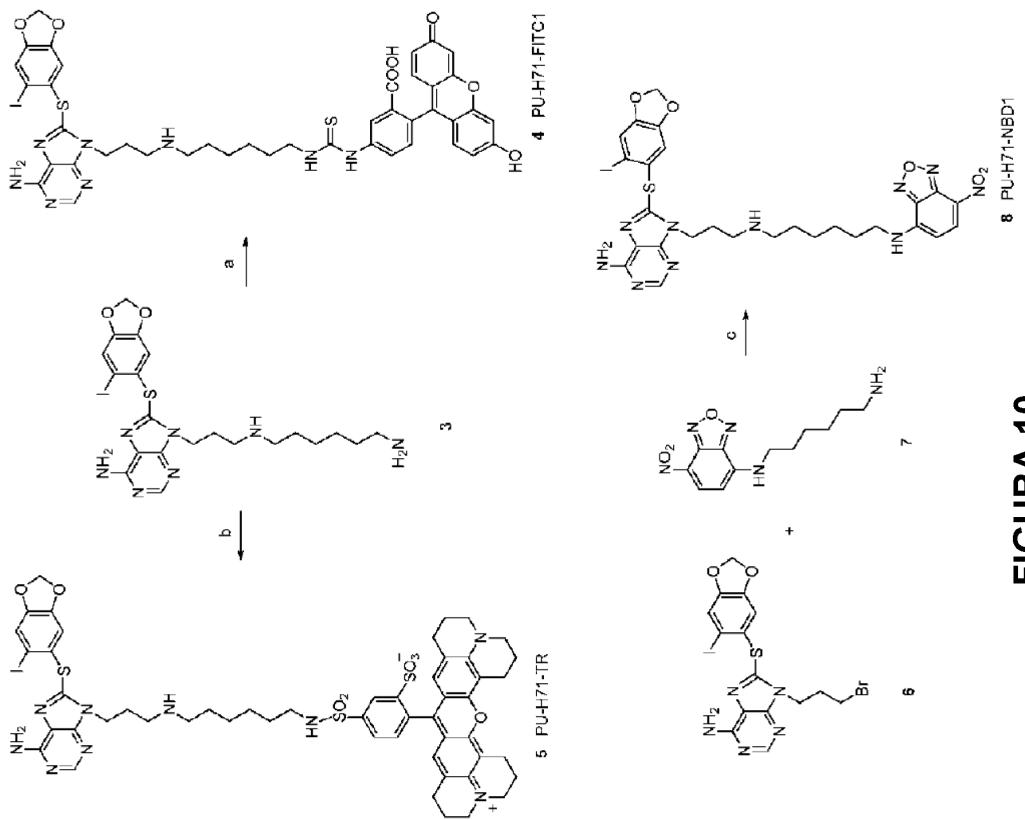


FIGURA 7a-b





**FIGURA 10**

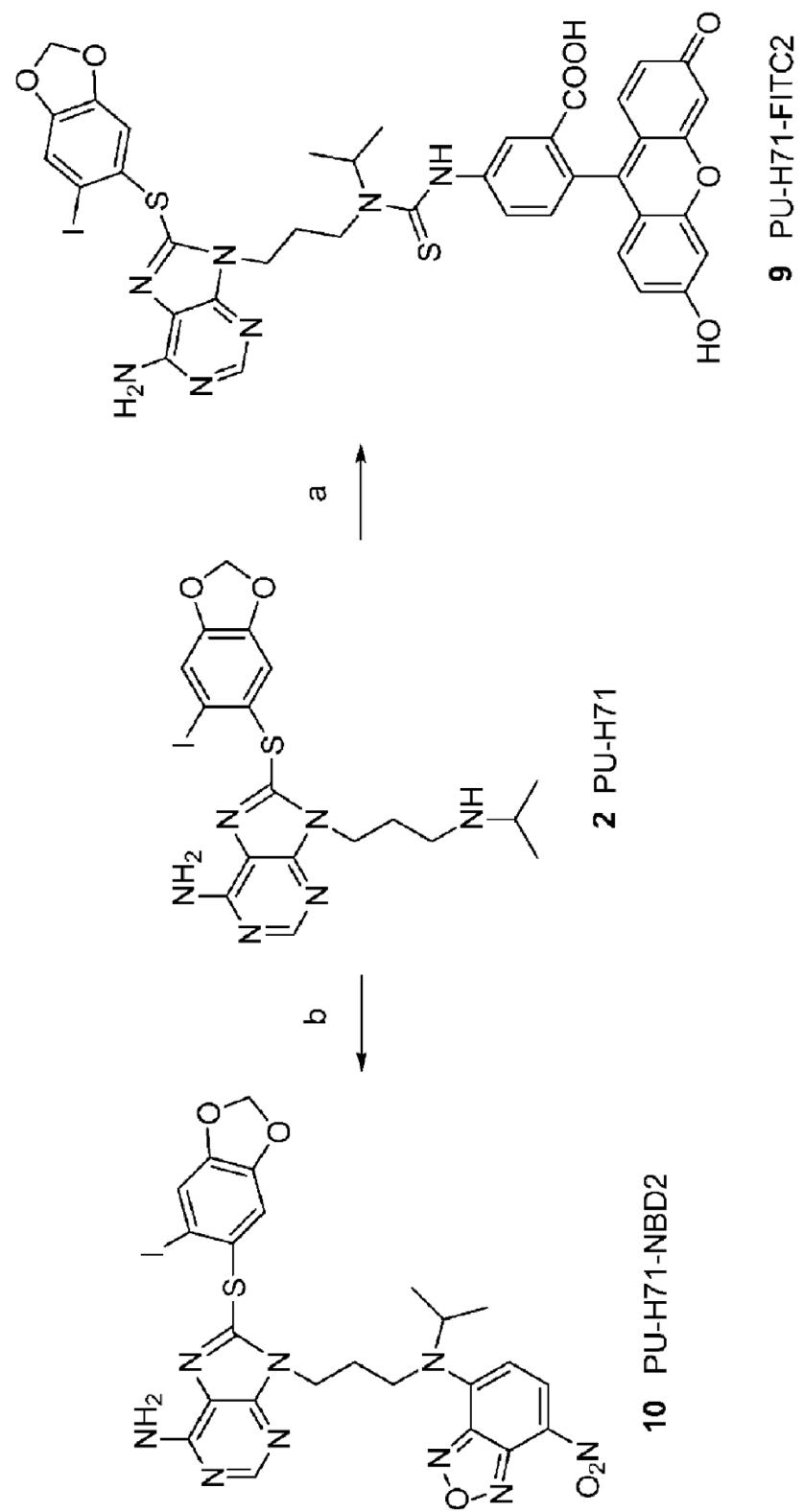


FIGURA 11

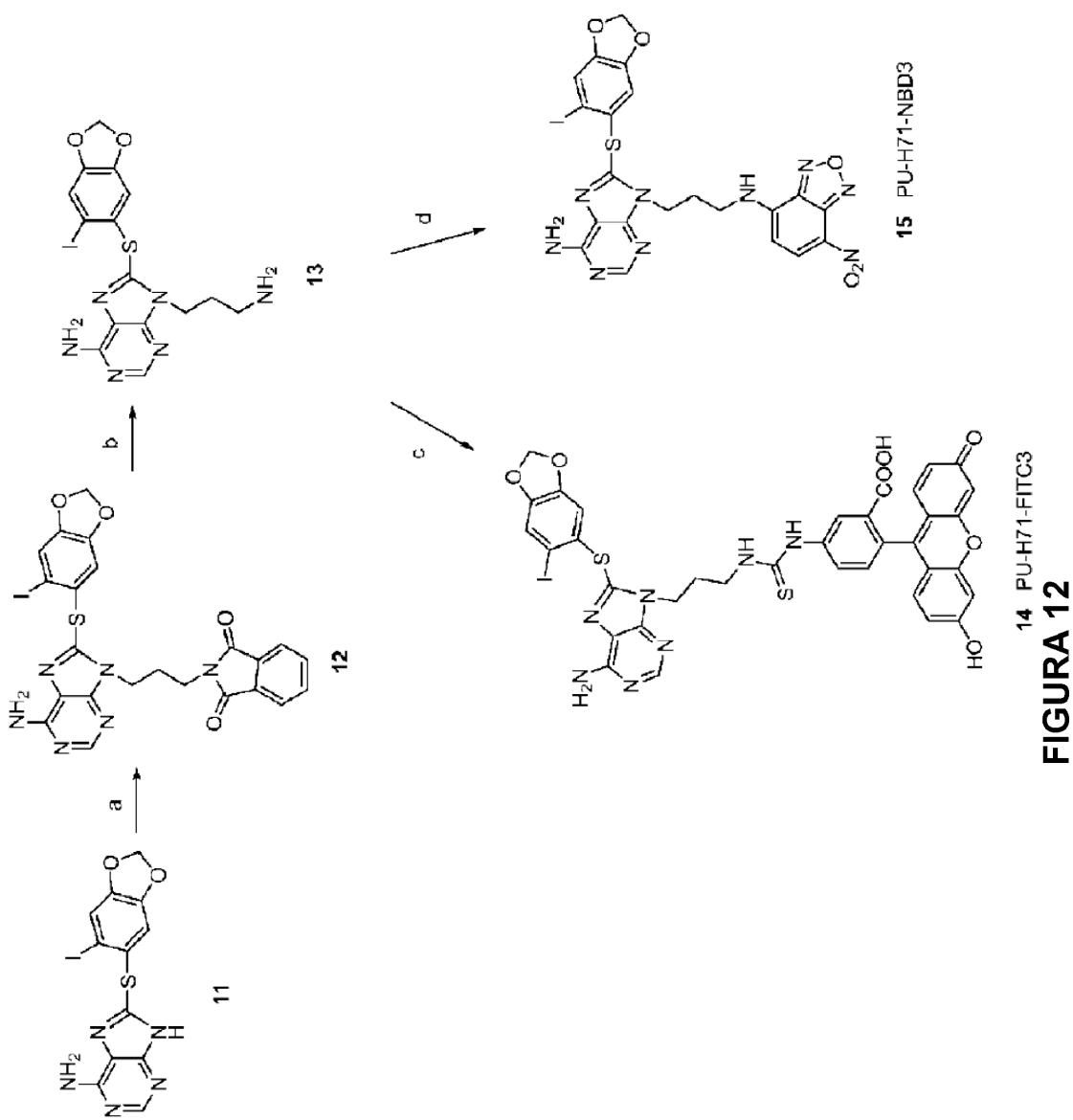
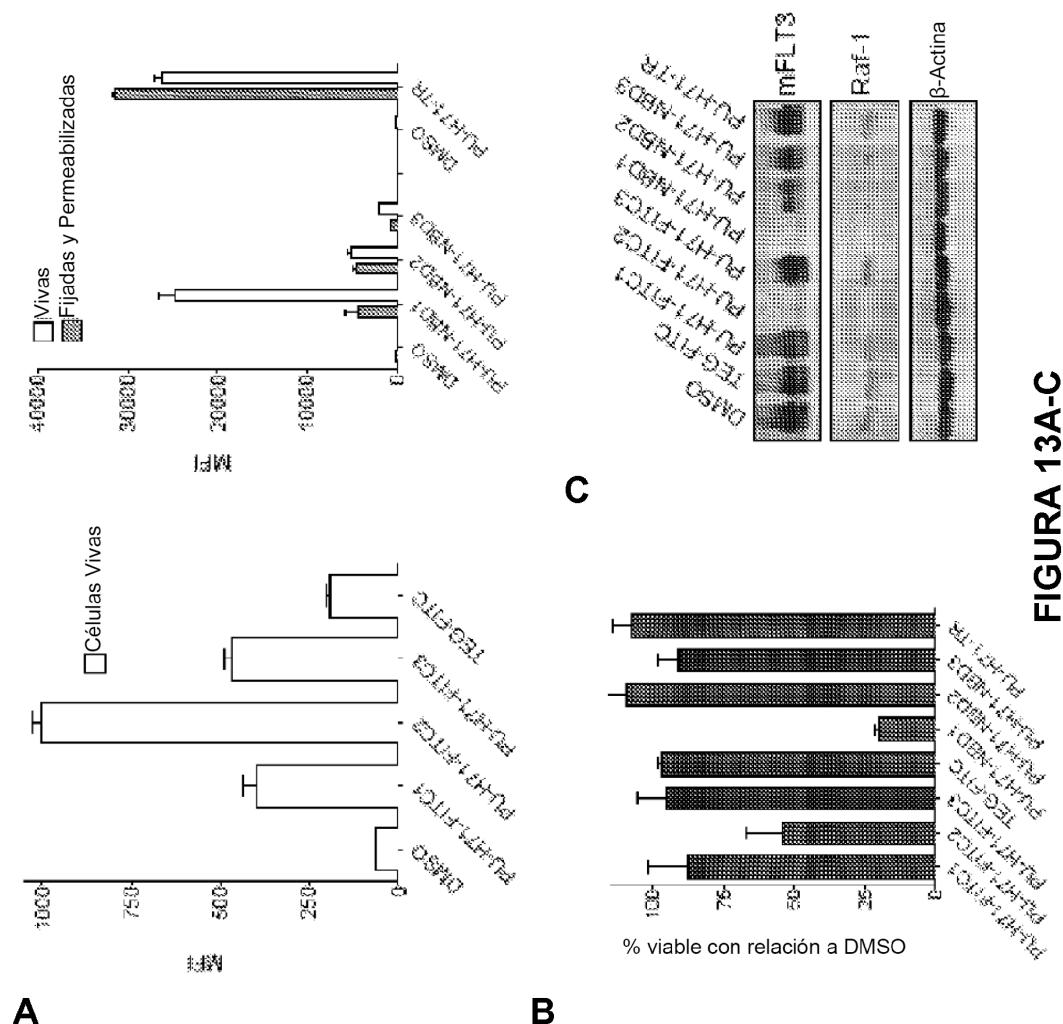


FIGURA 12
14 PU-H71-FITC3

**FIGURA 13A-C**

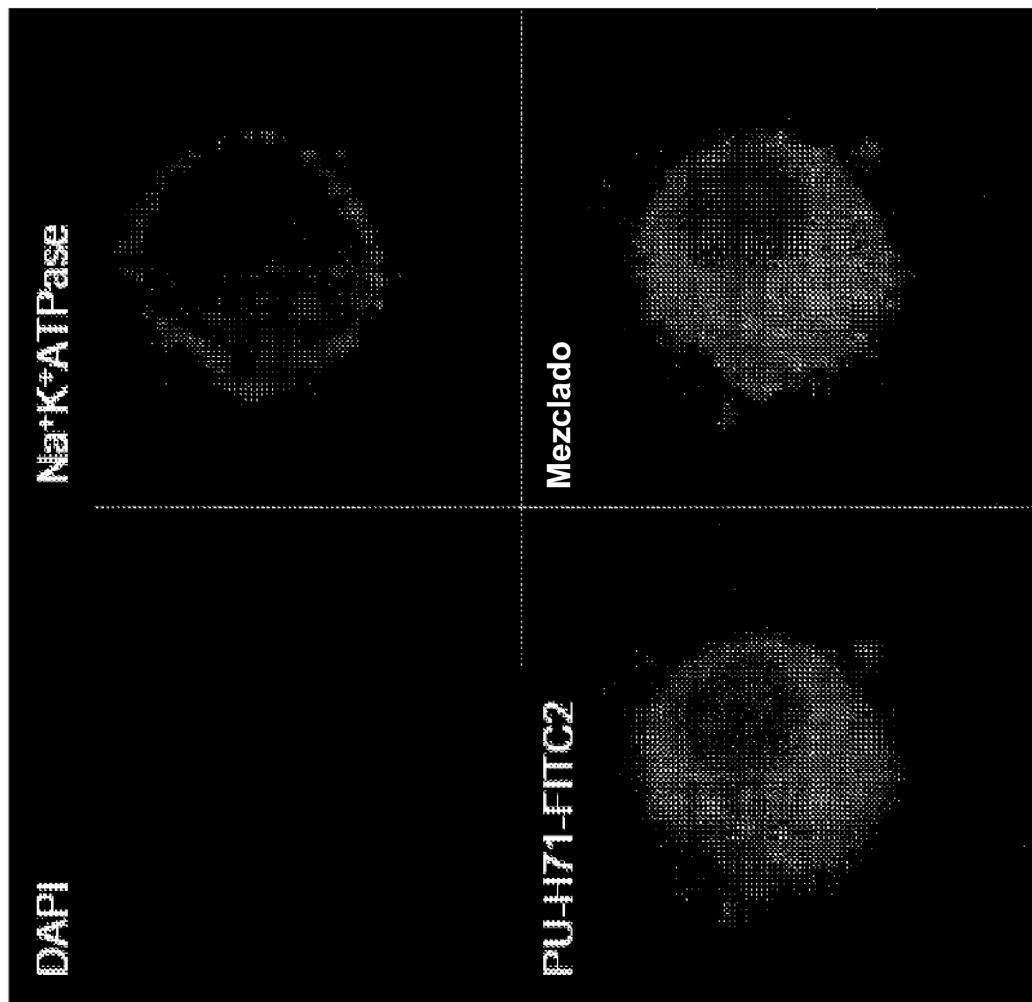
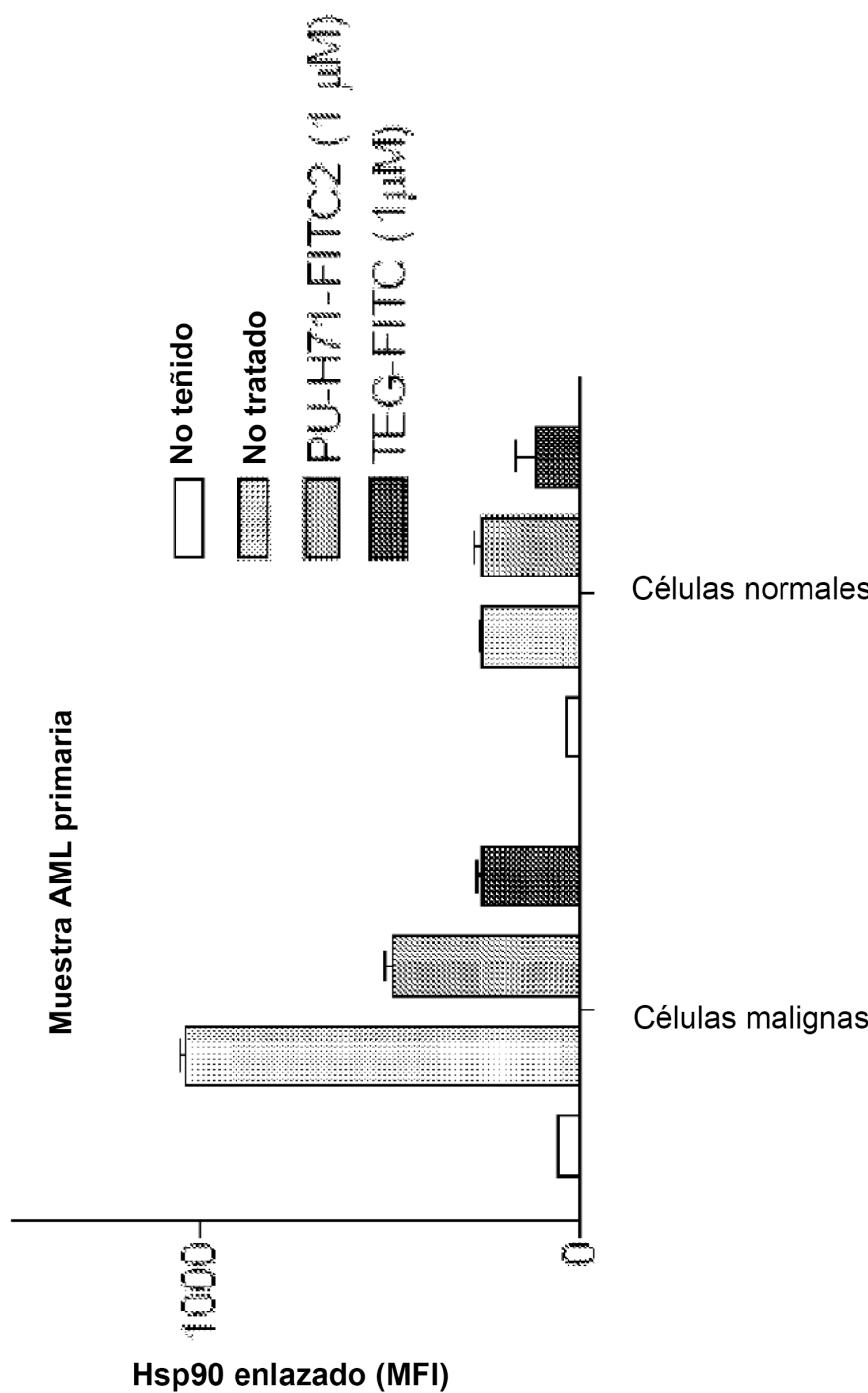
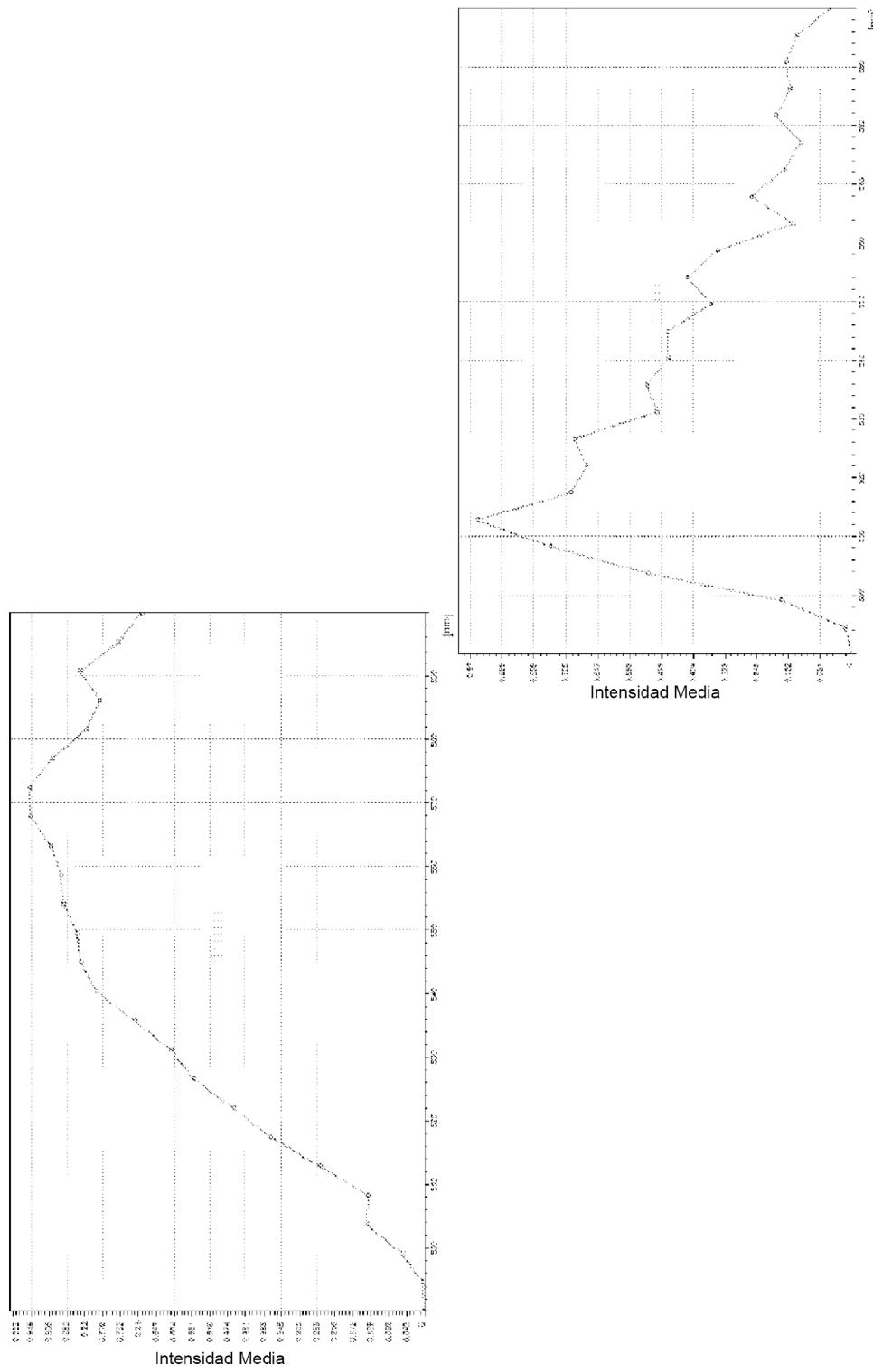


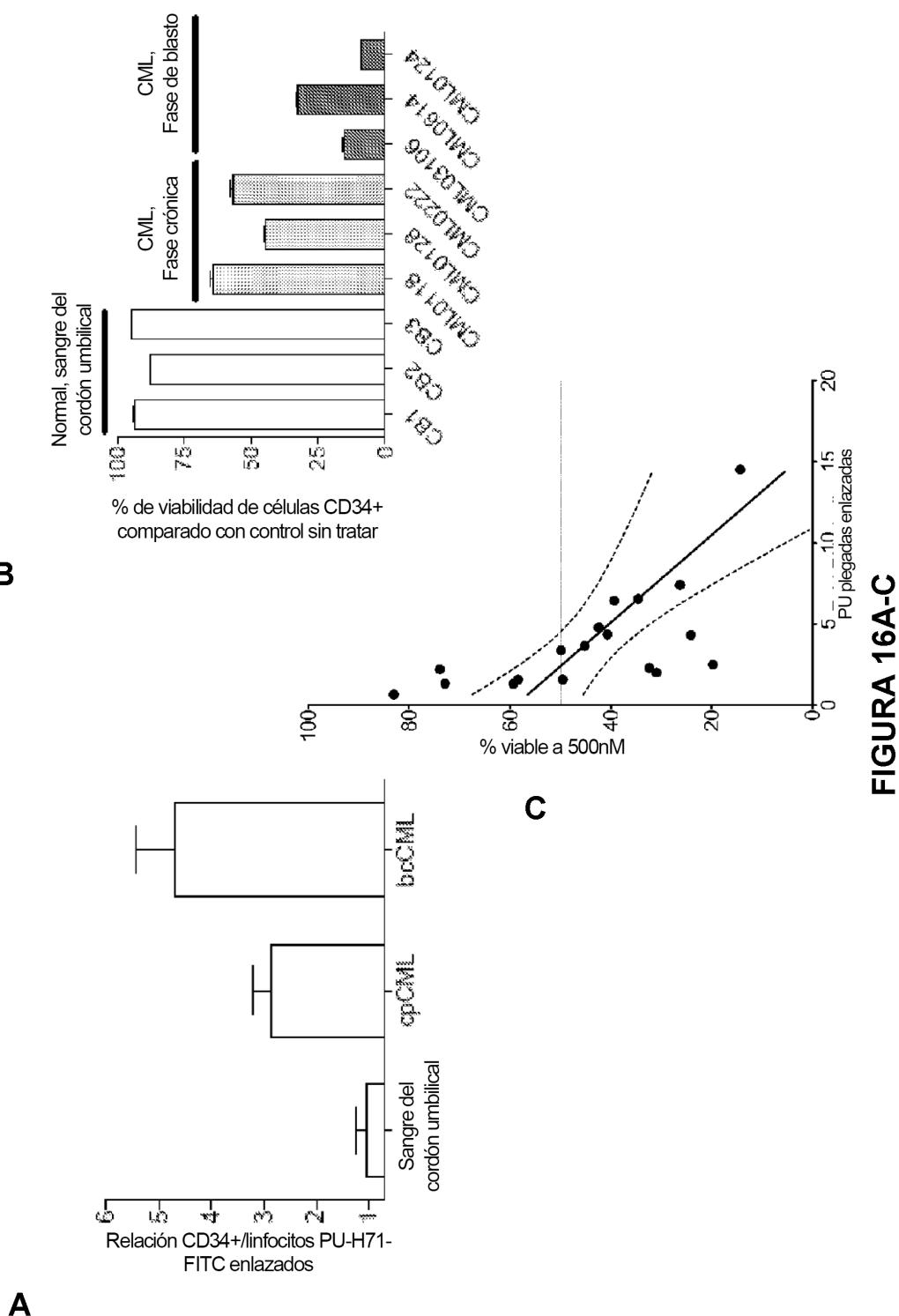
FIGURA 14A

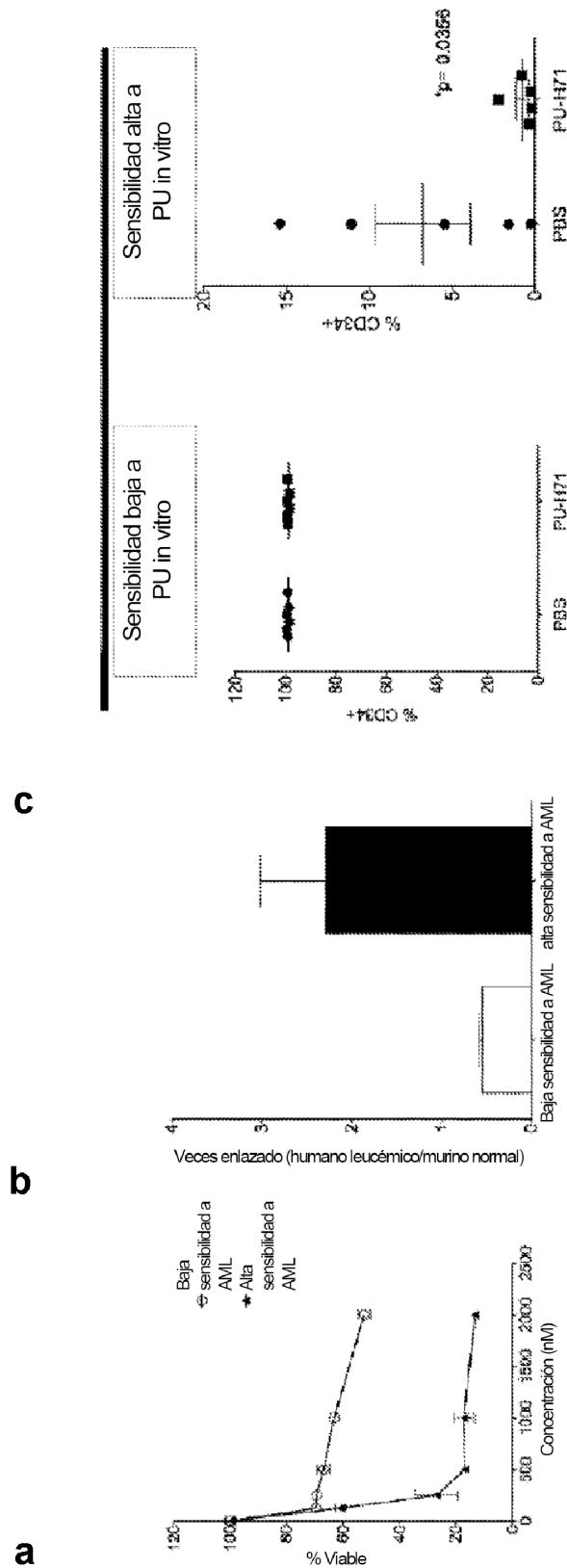




HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

FIGURA 15





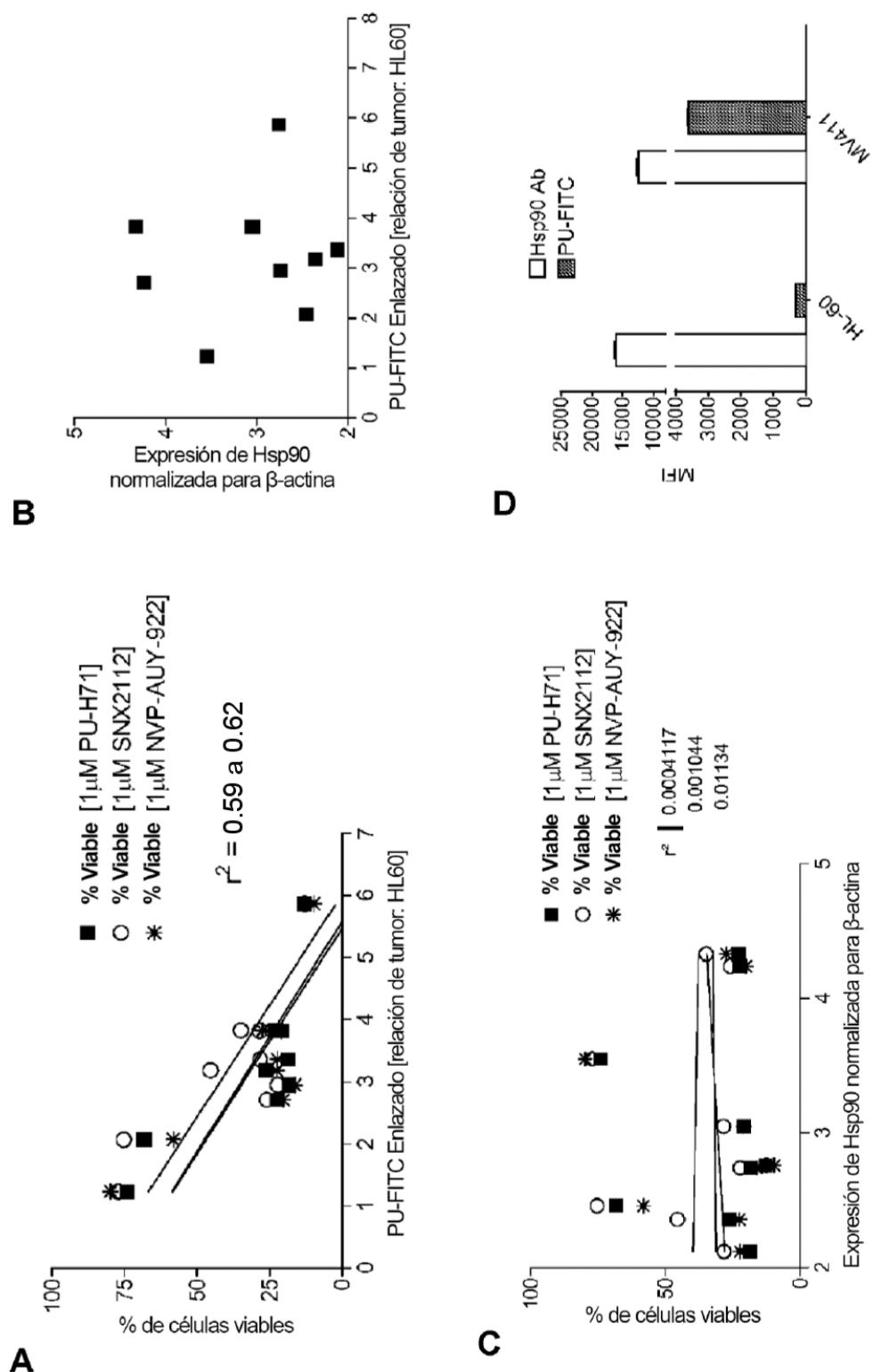


FIGURA 18A-D

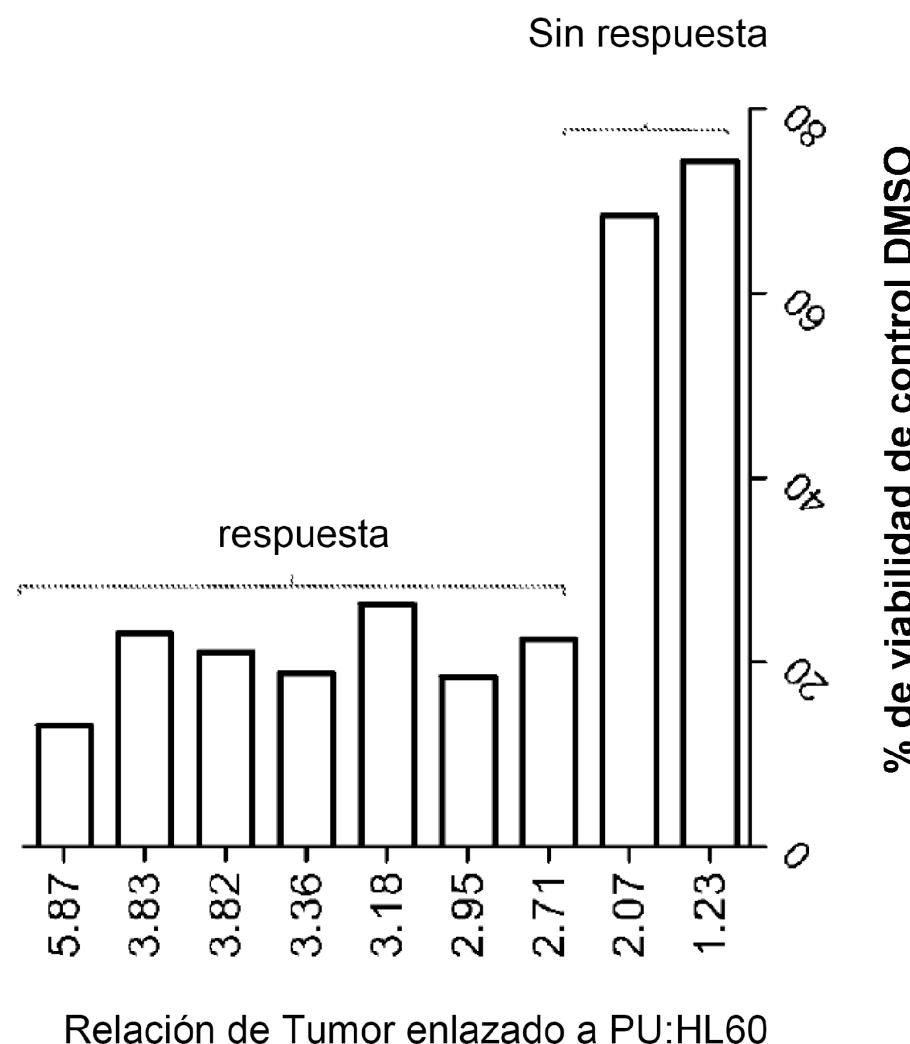


FIGURA 19

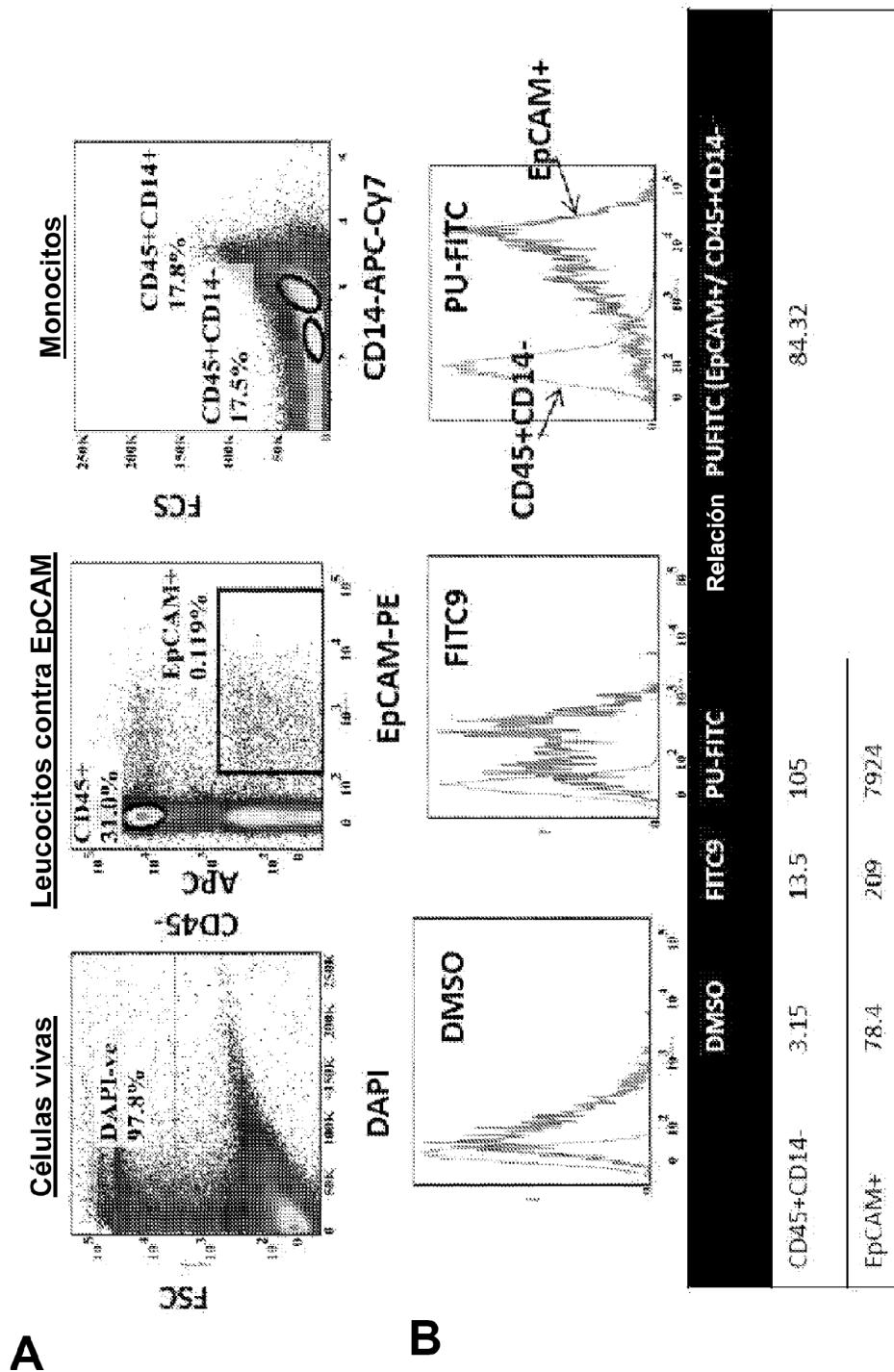


FIGURA 20A-B

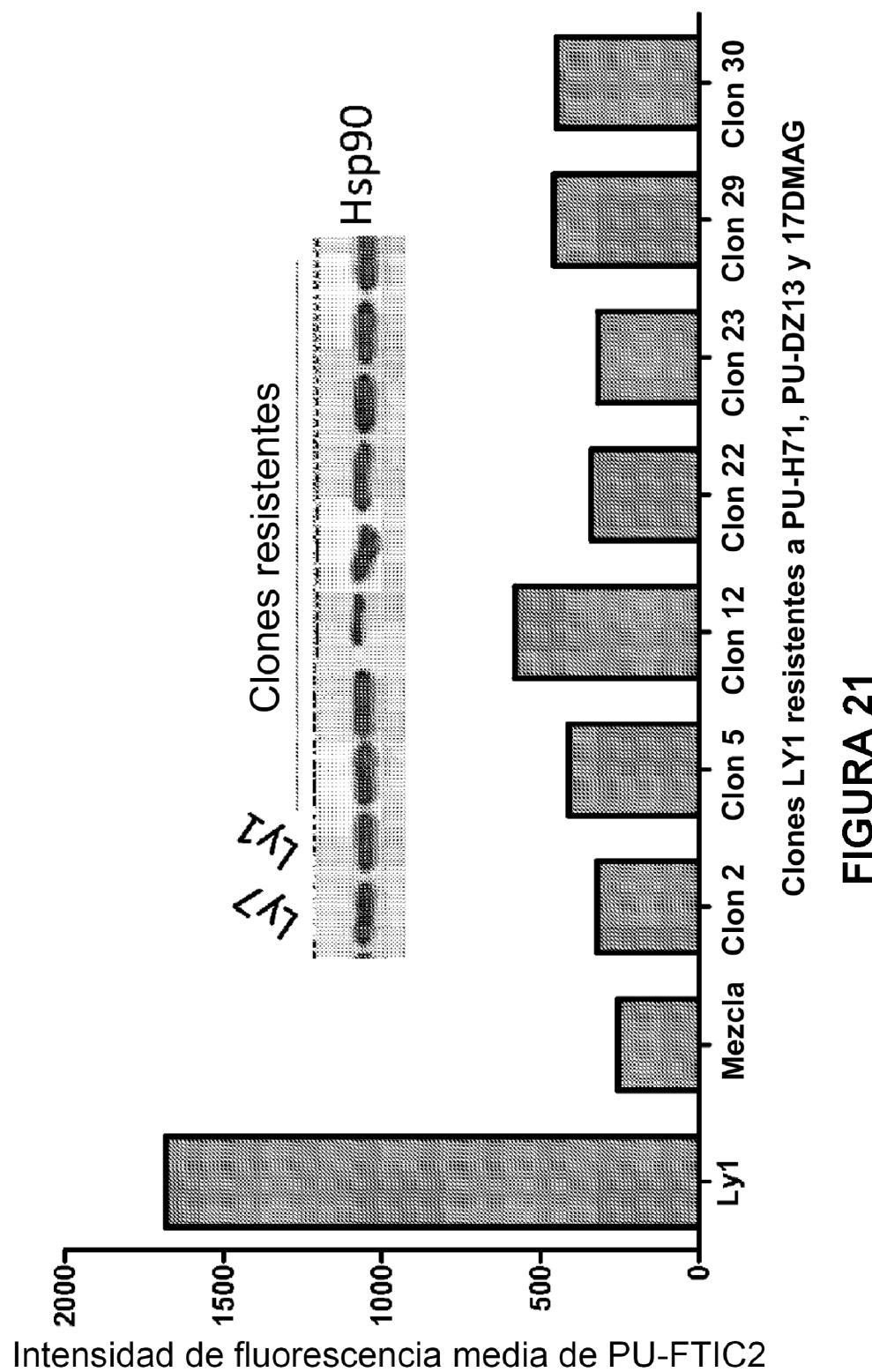


FIGURA 21

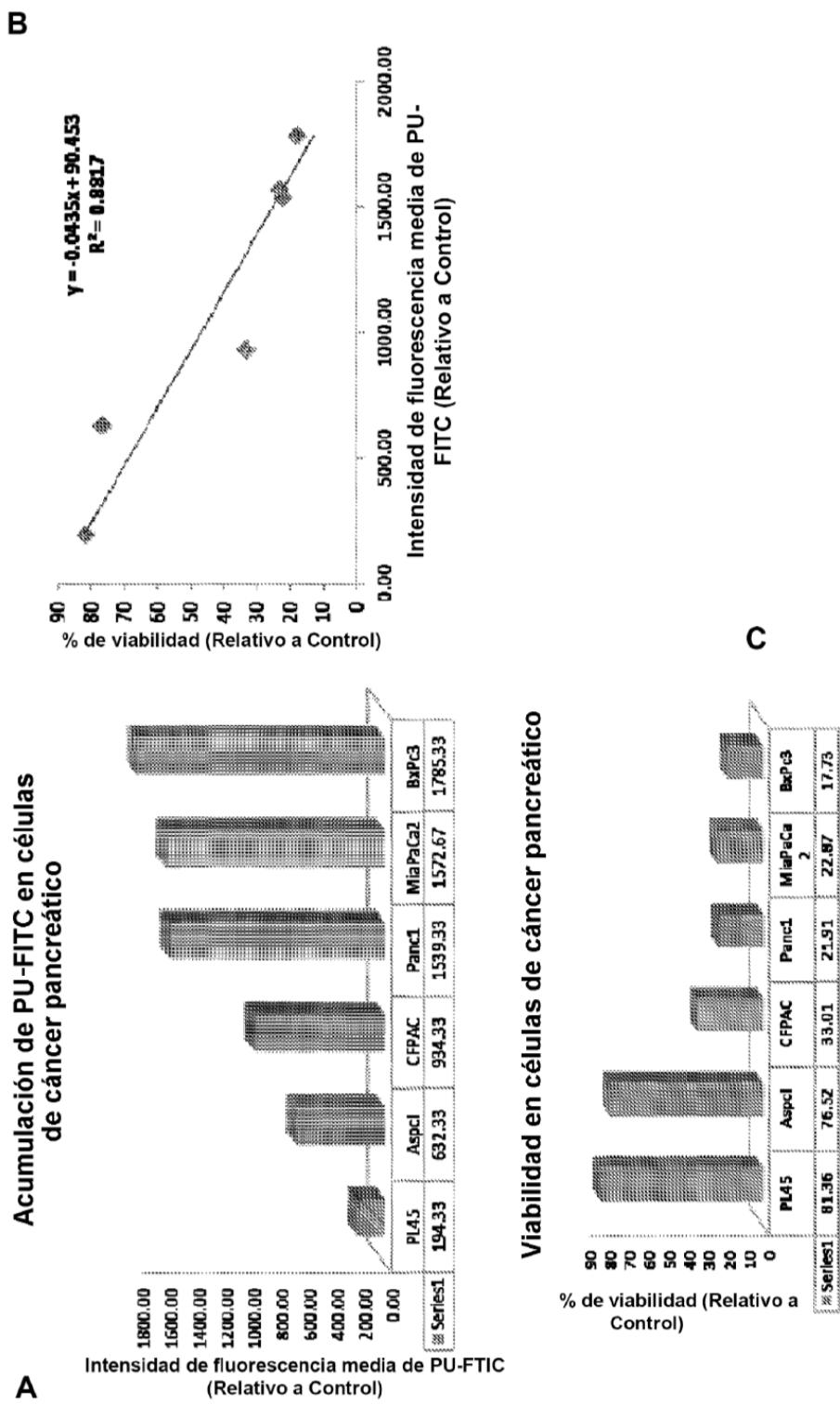


FIGURA 22A-C

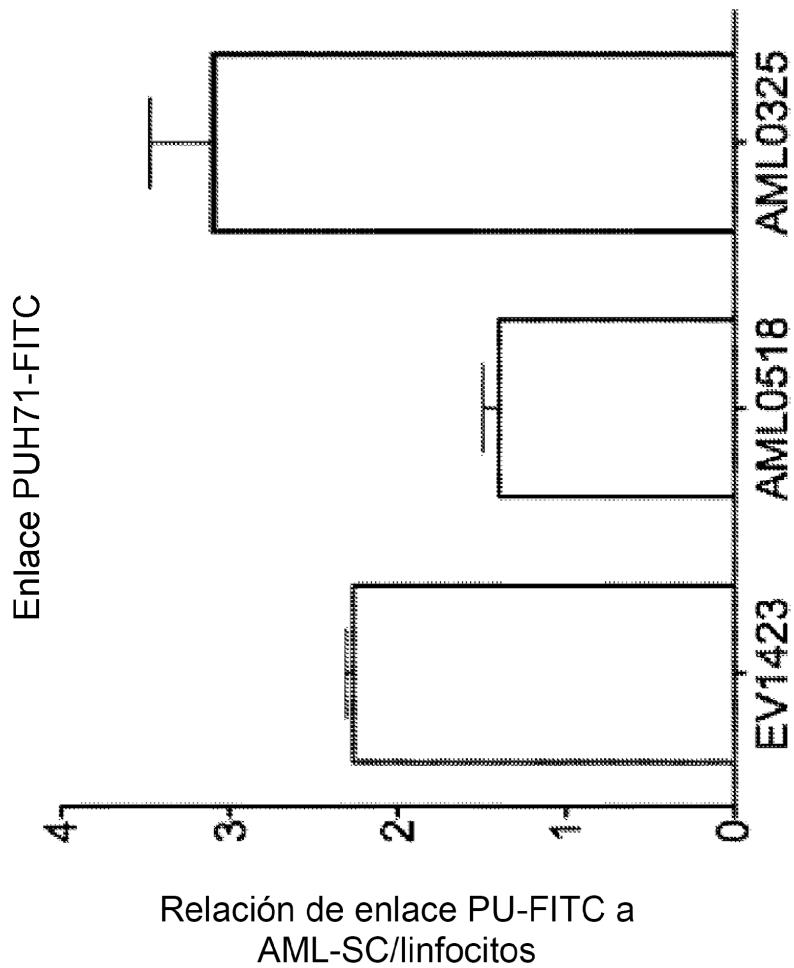


FIGURA 23A

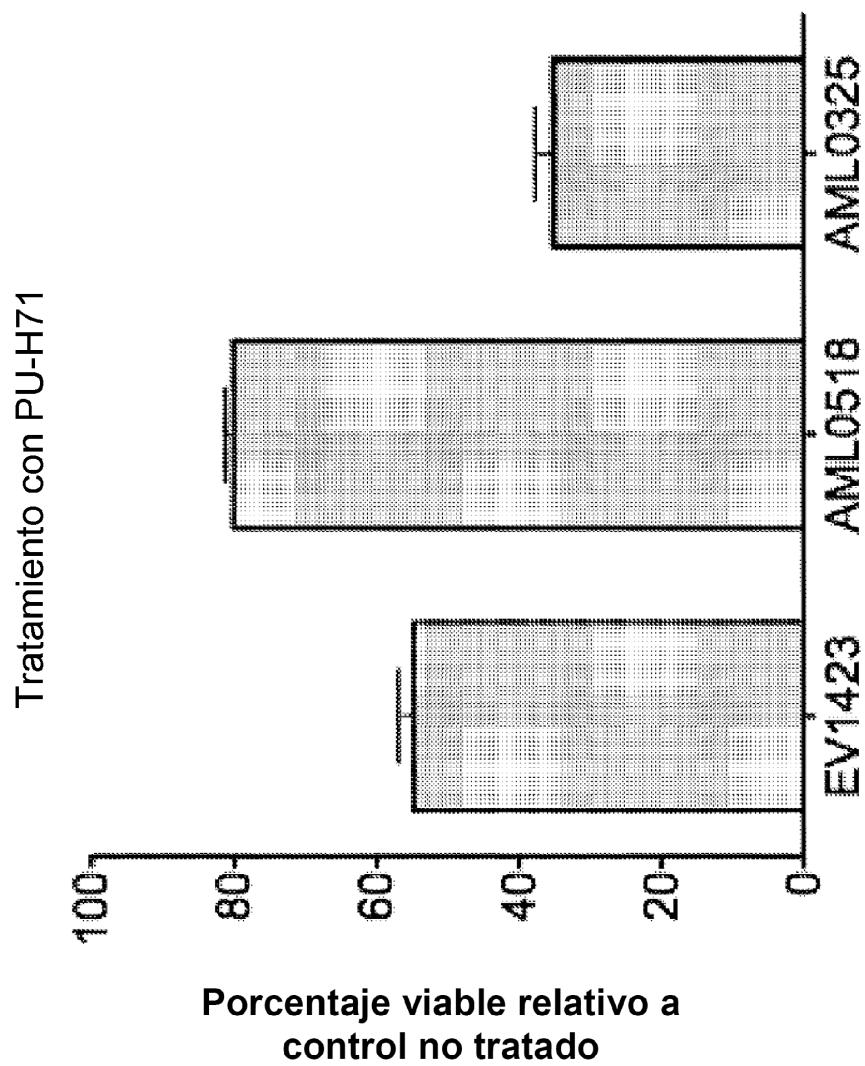


FIGURA 23B

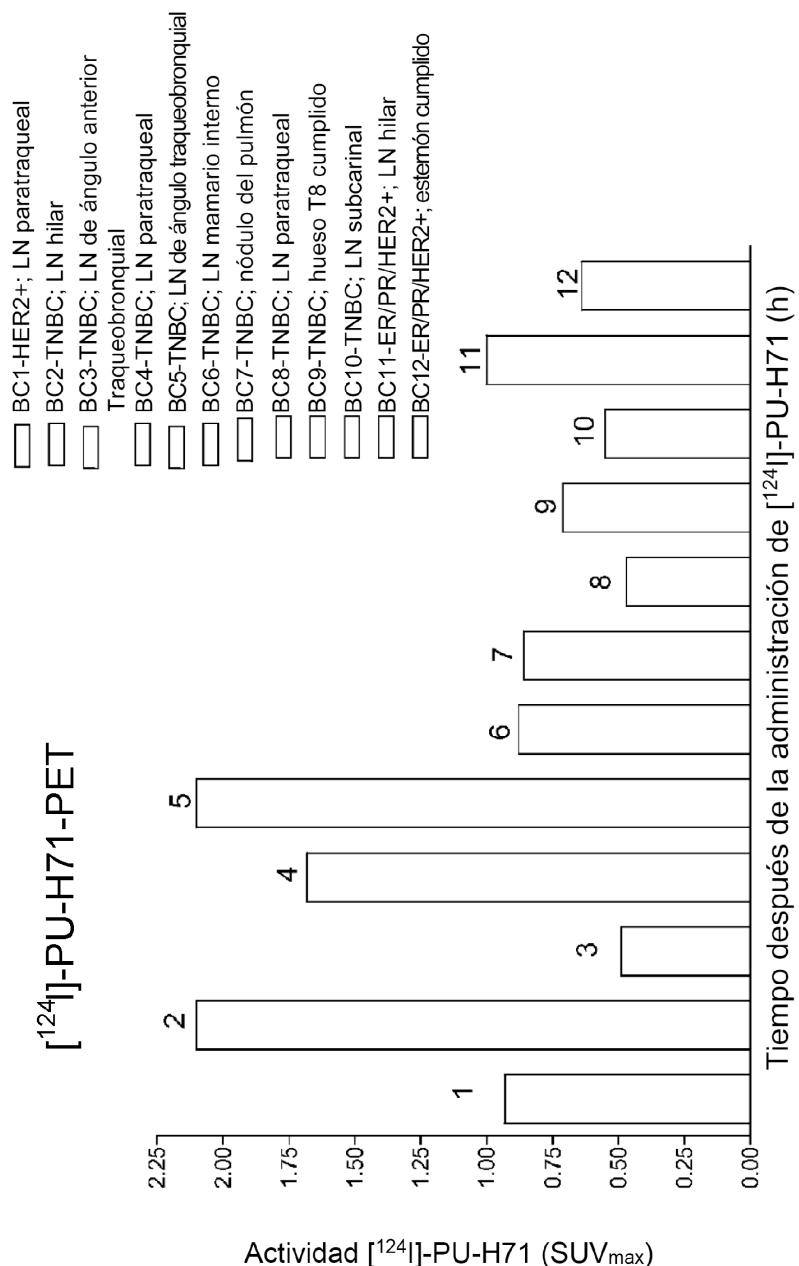
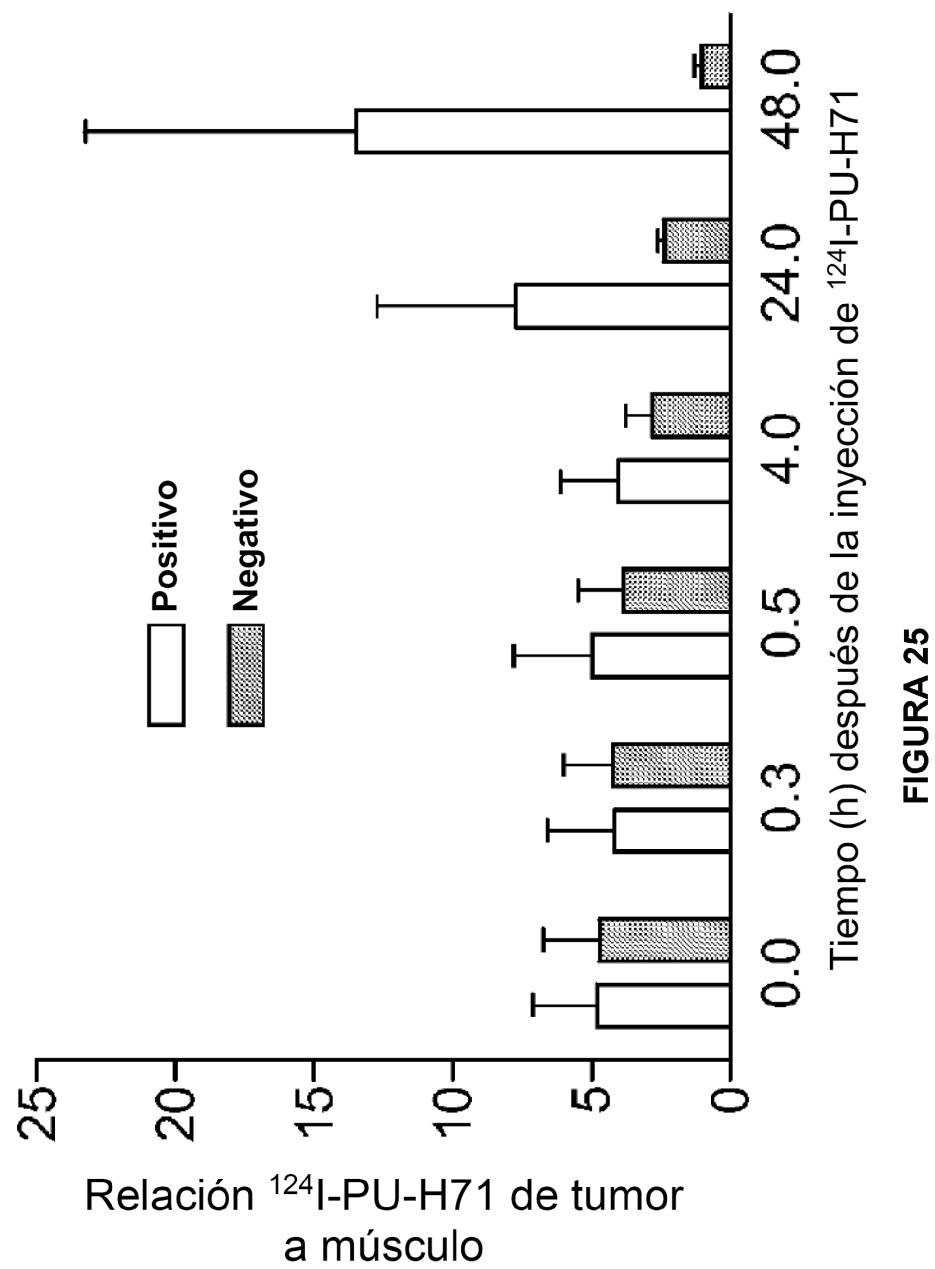


FIGURA 24



PET-CT de ^{124}I -PUH71 de un paciente con linfoma de células del manto

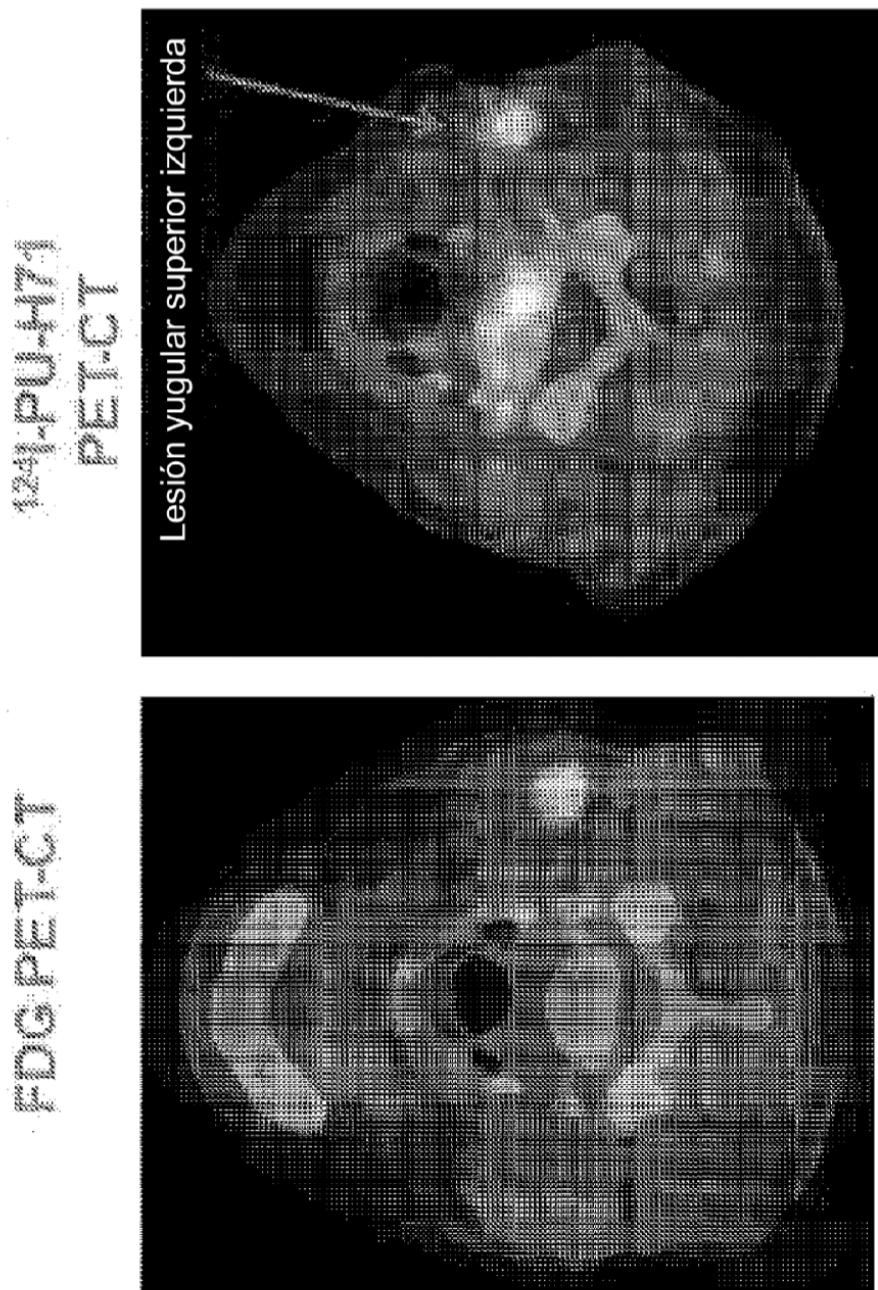


FIGURA 26

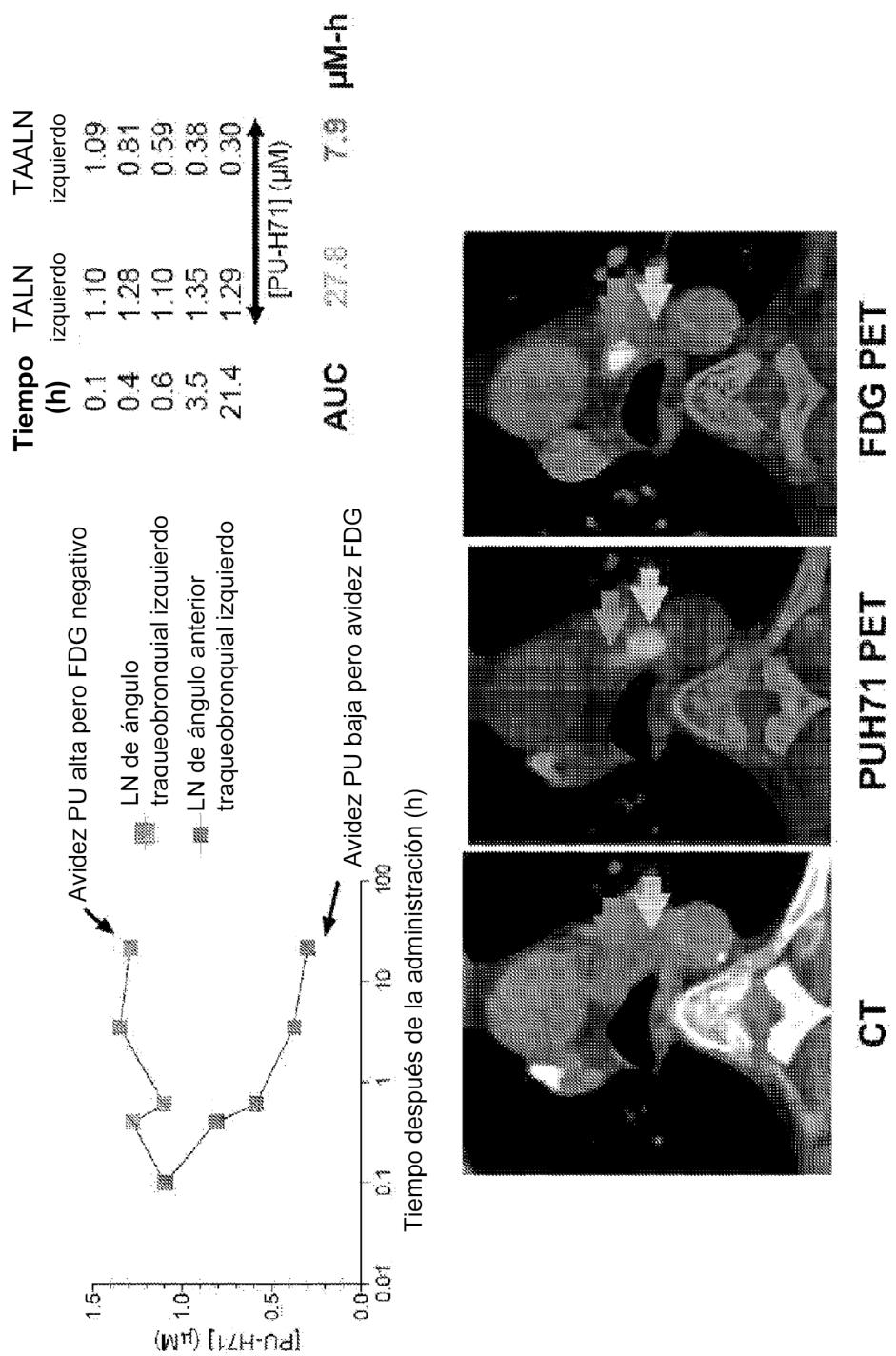


FIGURA 27

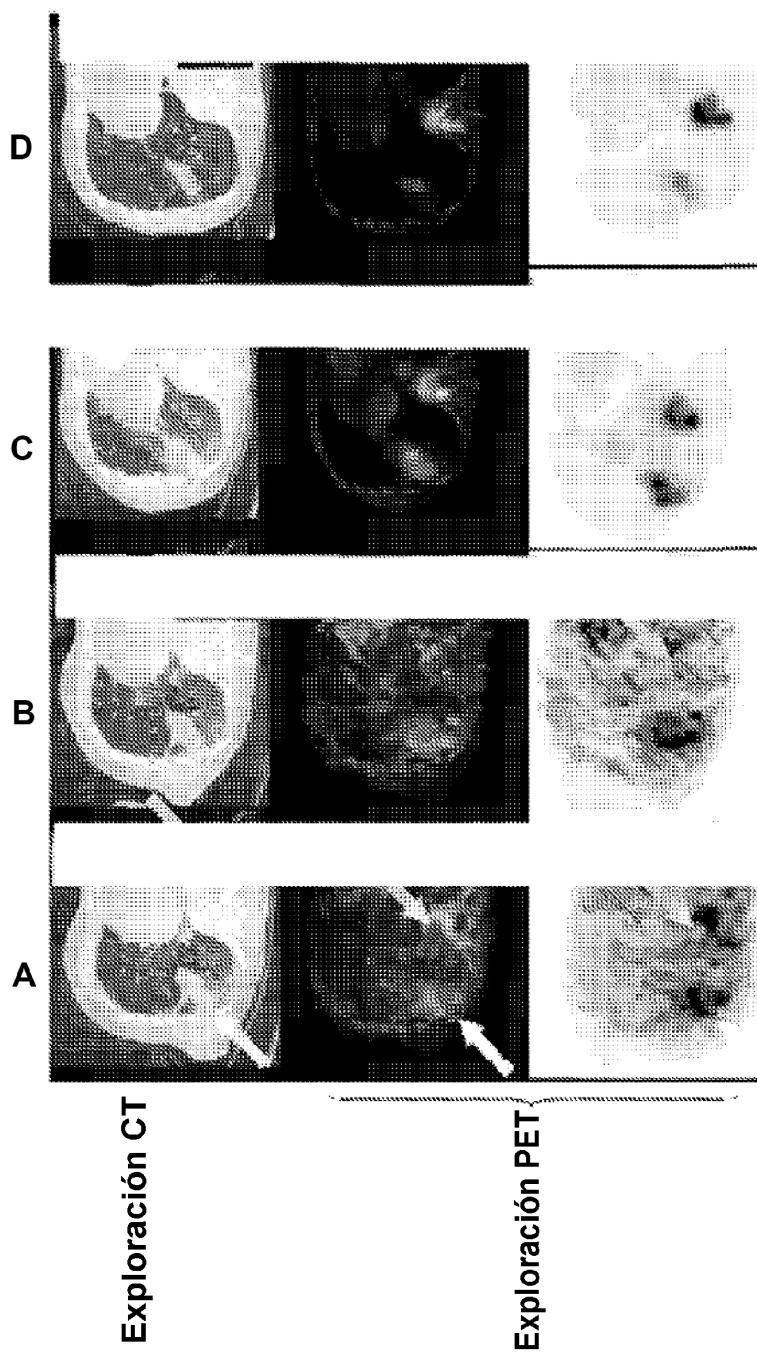


FIGURA 28A-D

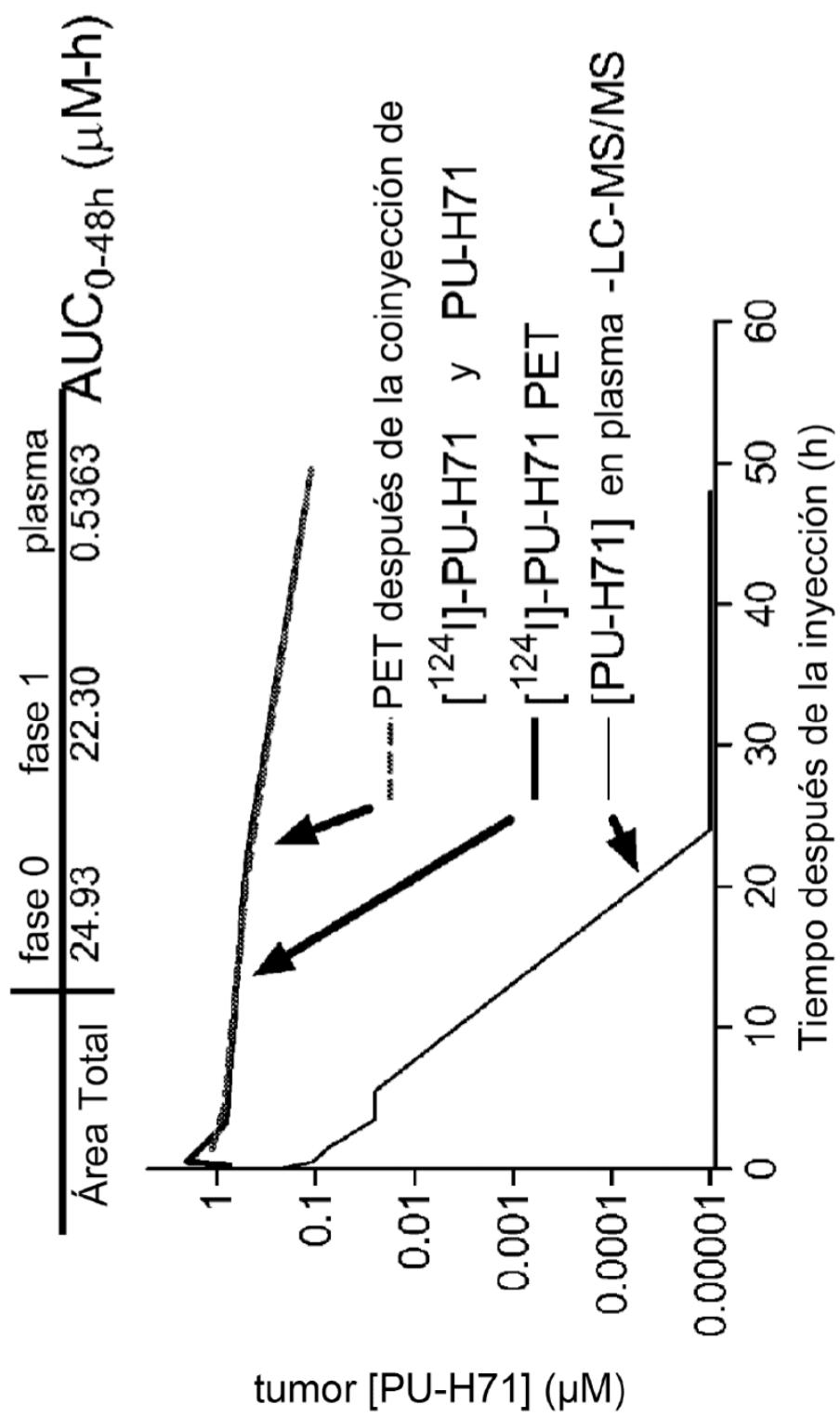


FIGURA 29

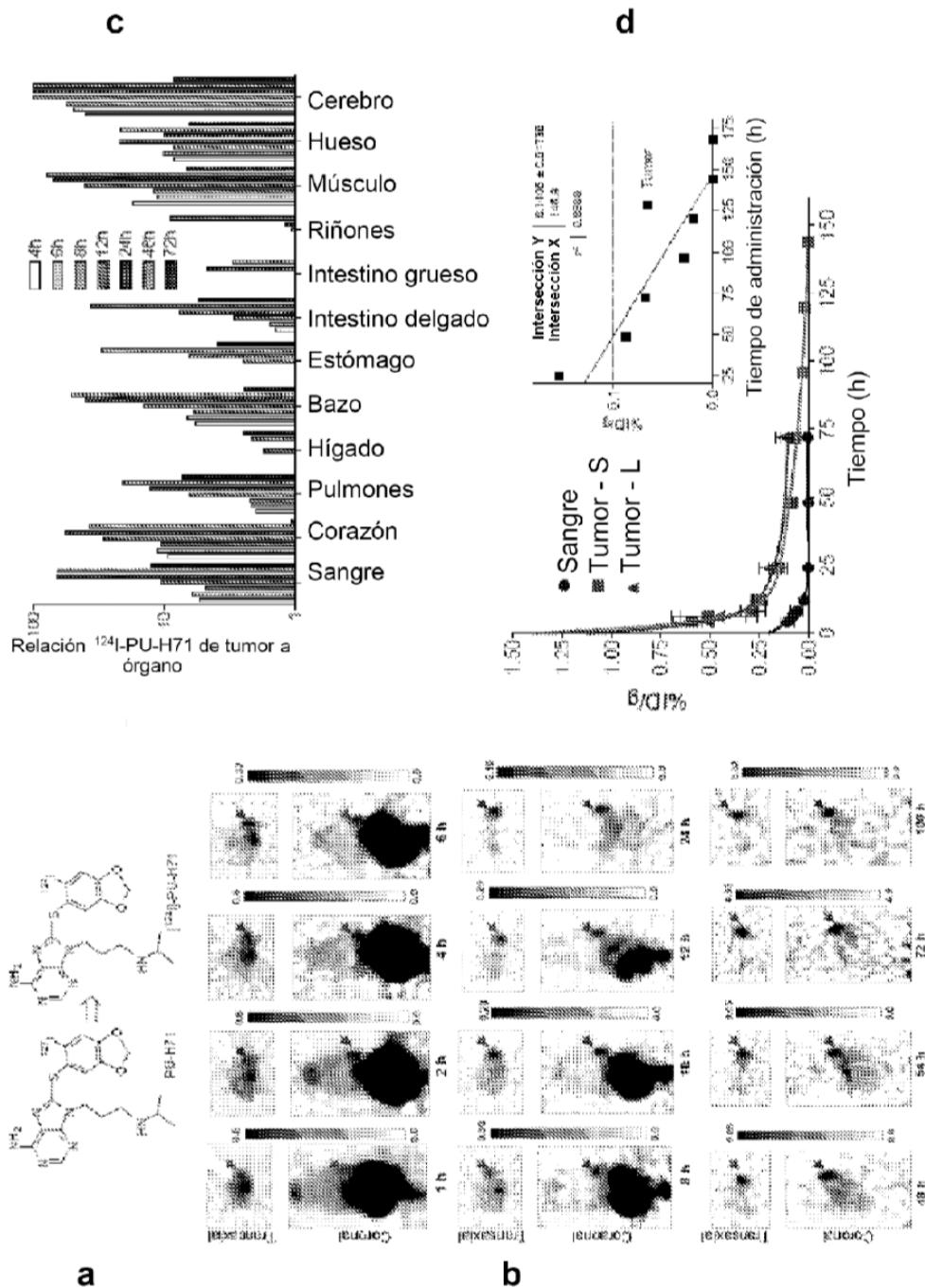


FIGURA 30a-d

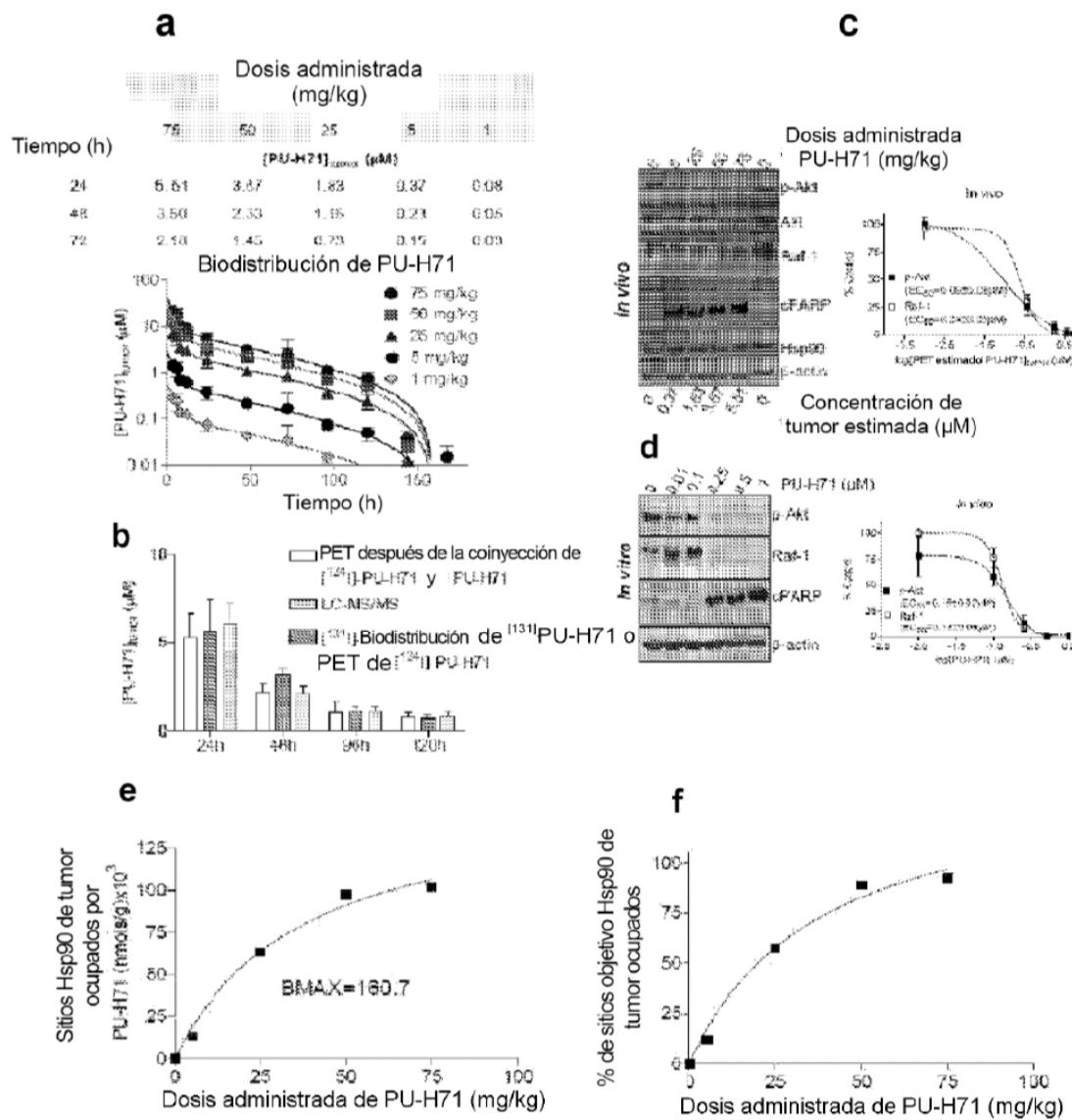


FIGURA 31a-f

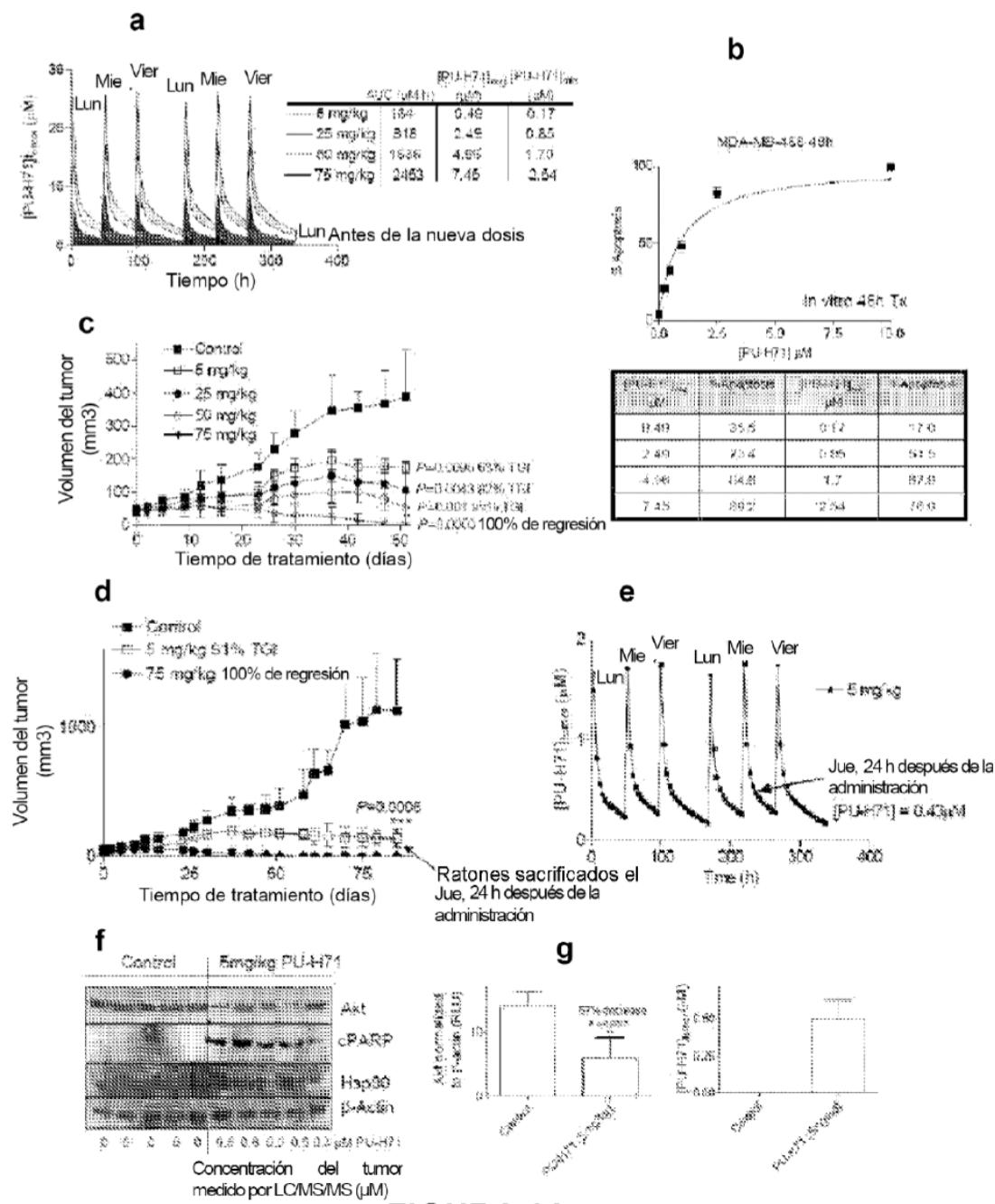


FIGURA 32a-g

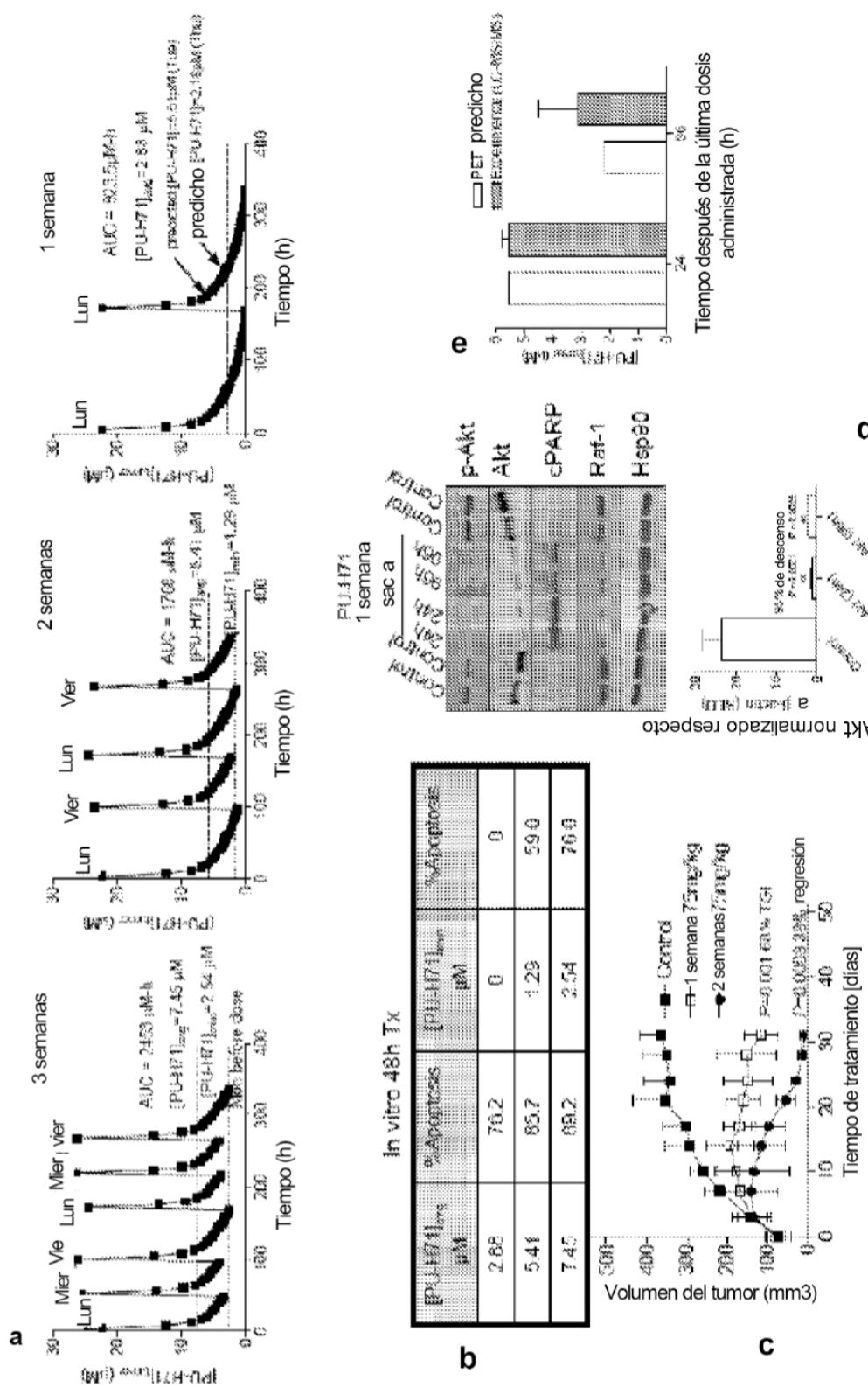


FIGURA 33a-e

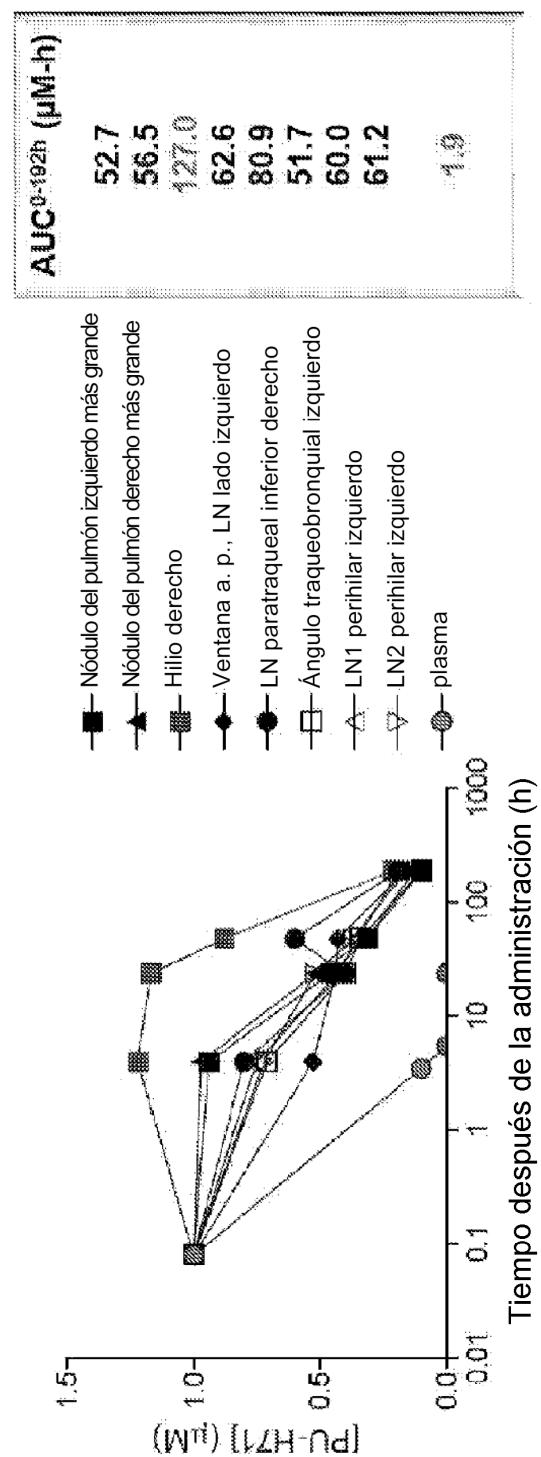
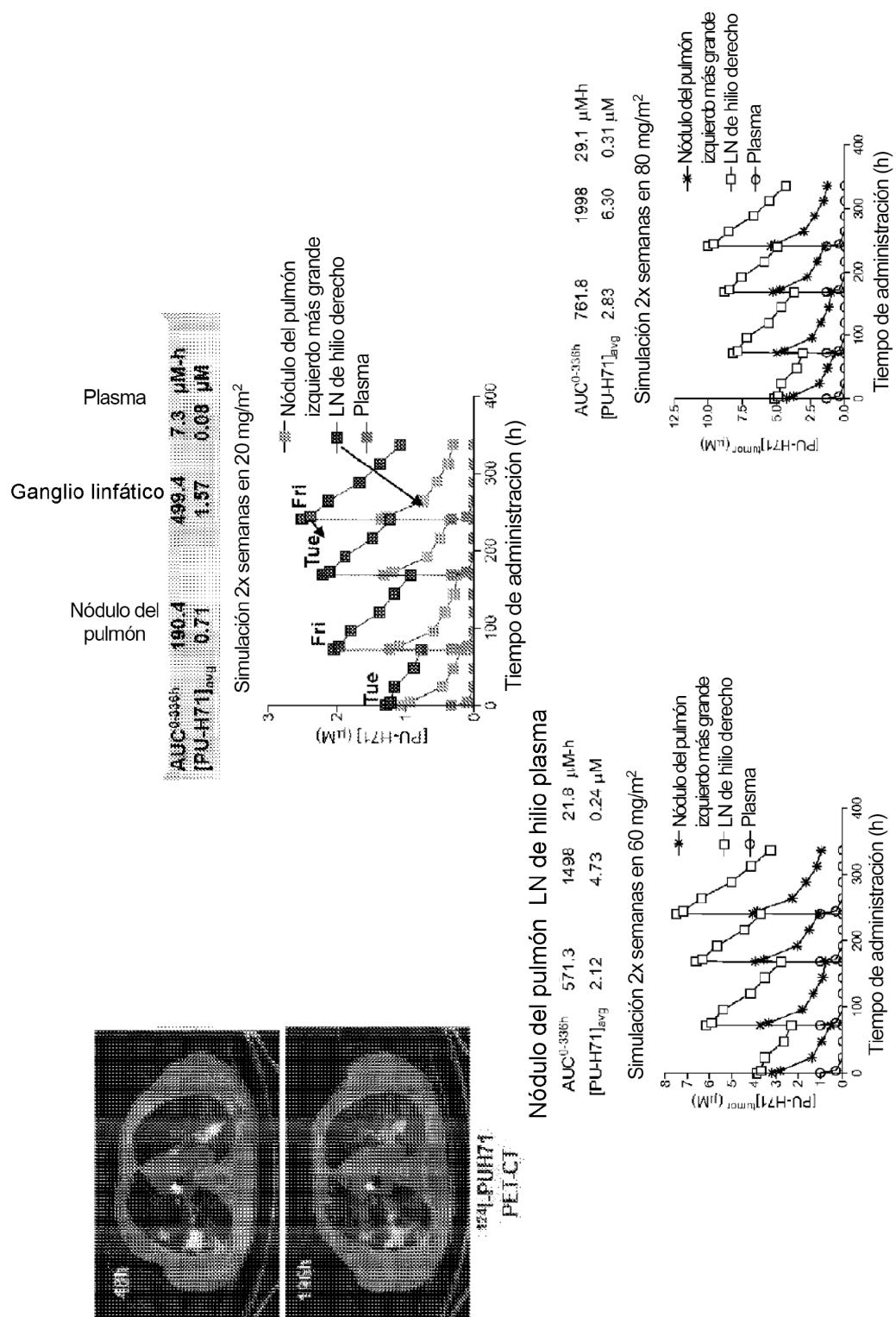
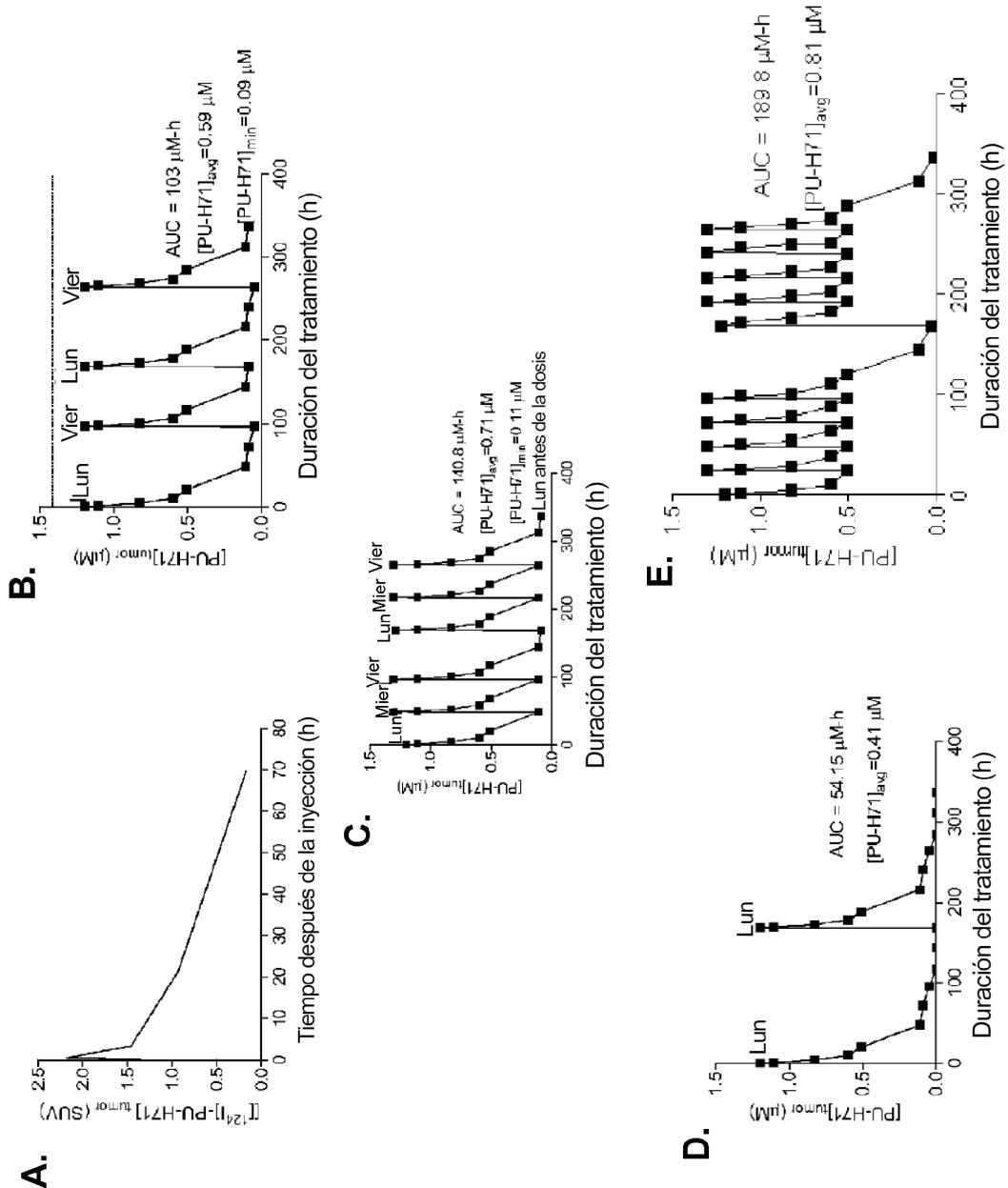


FIGURA 34

**FIGURA 35**

**FIGURA 36A-E**

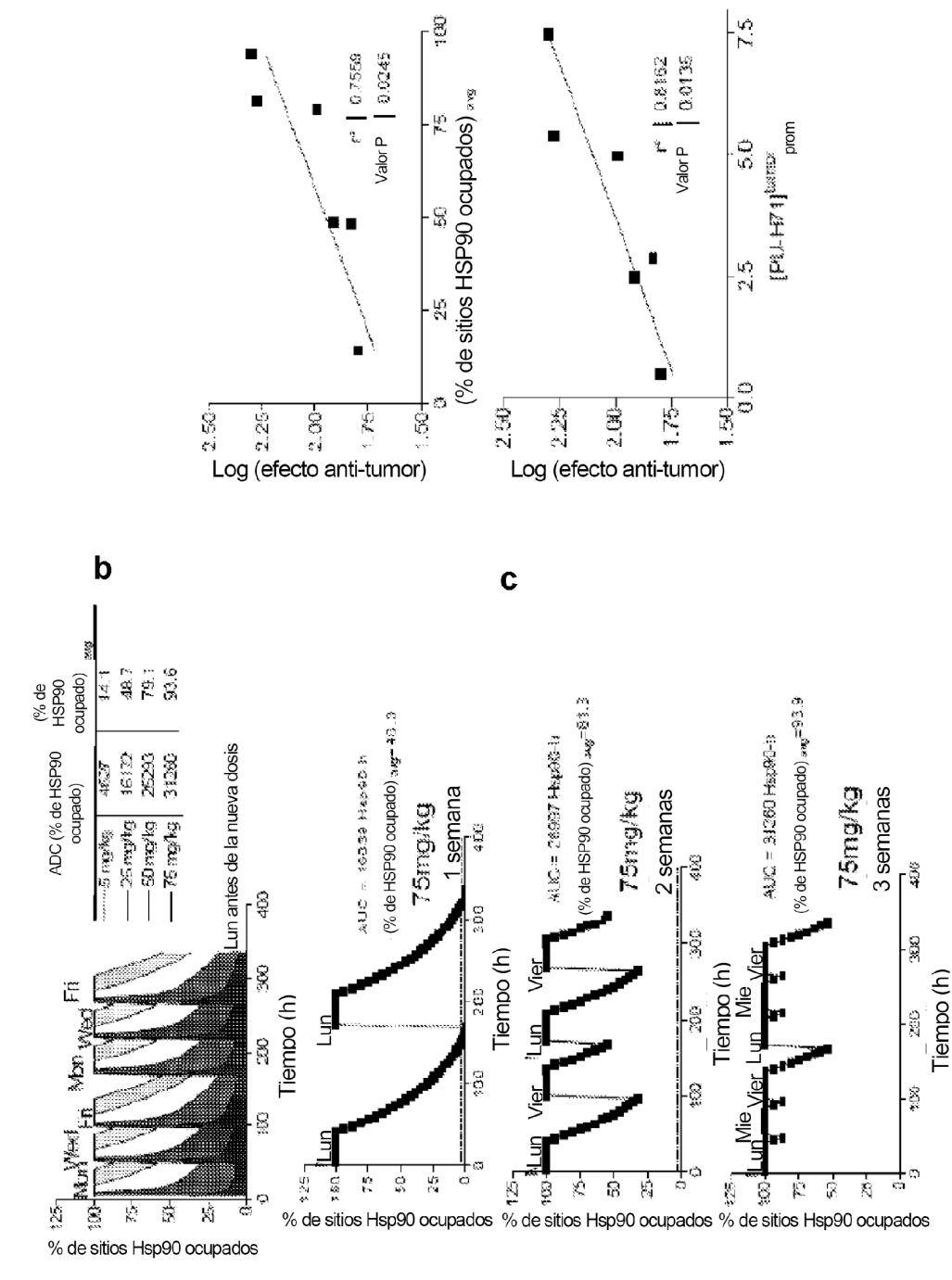
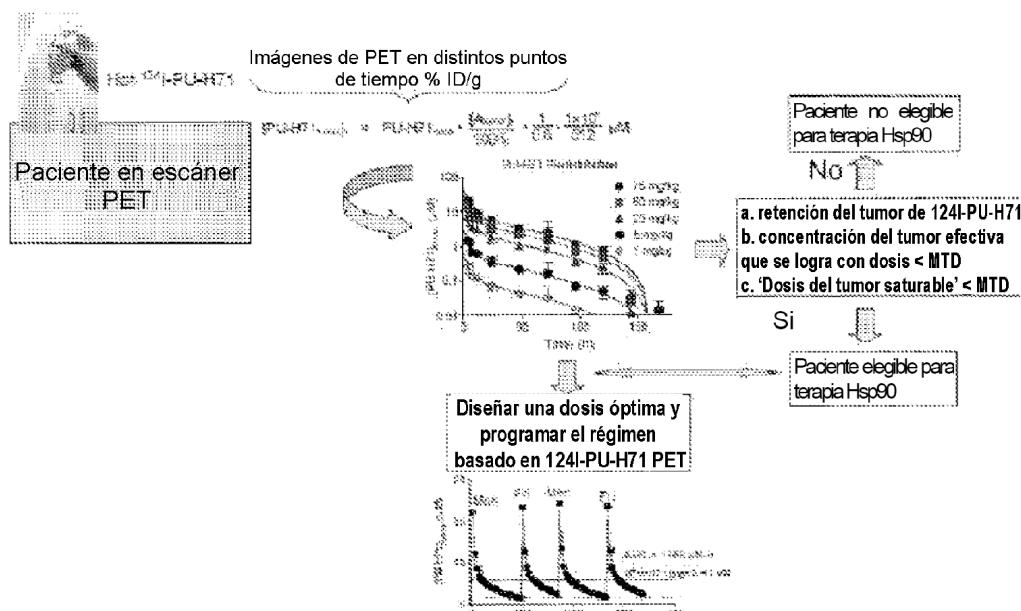
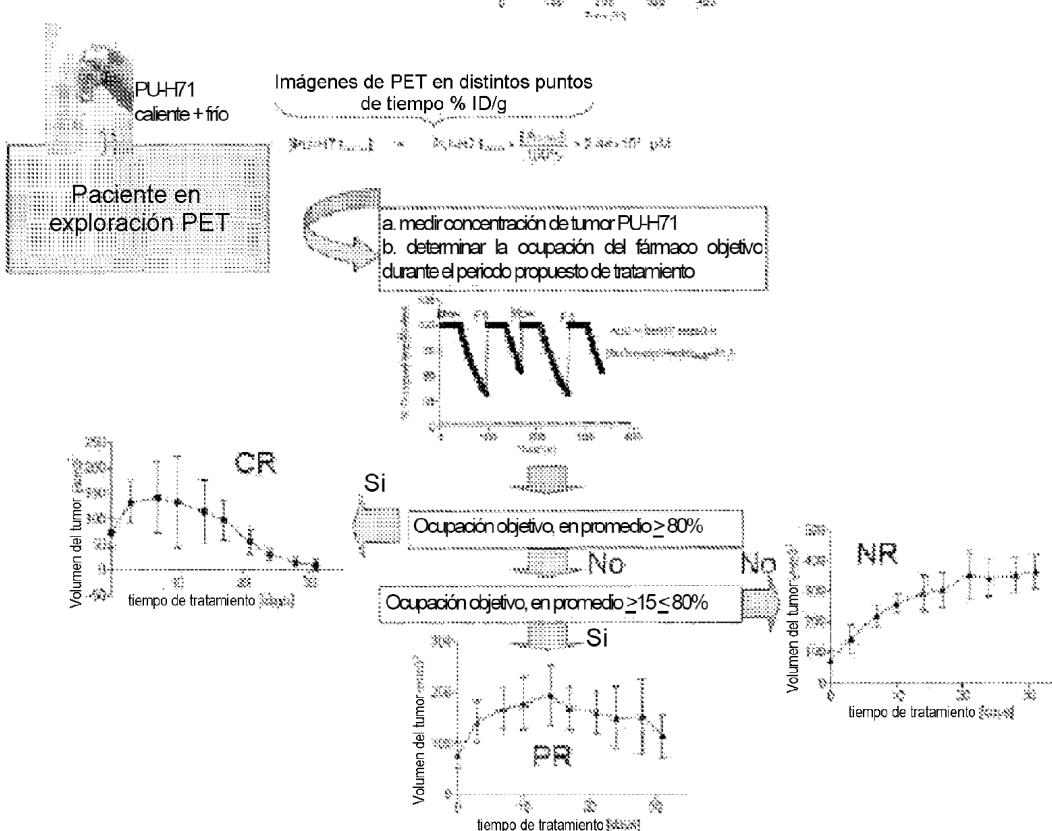
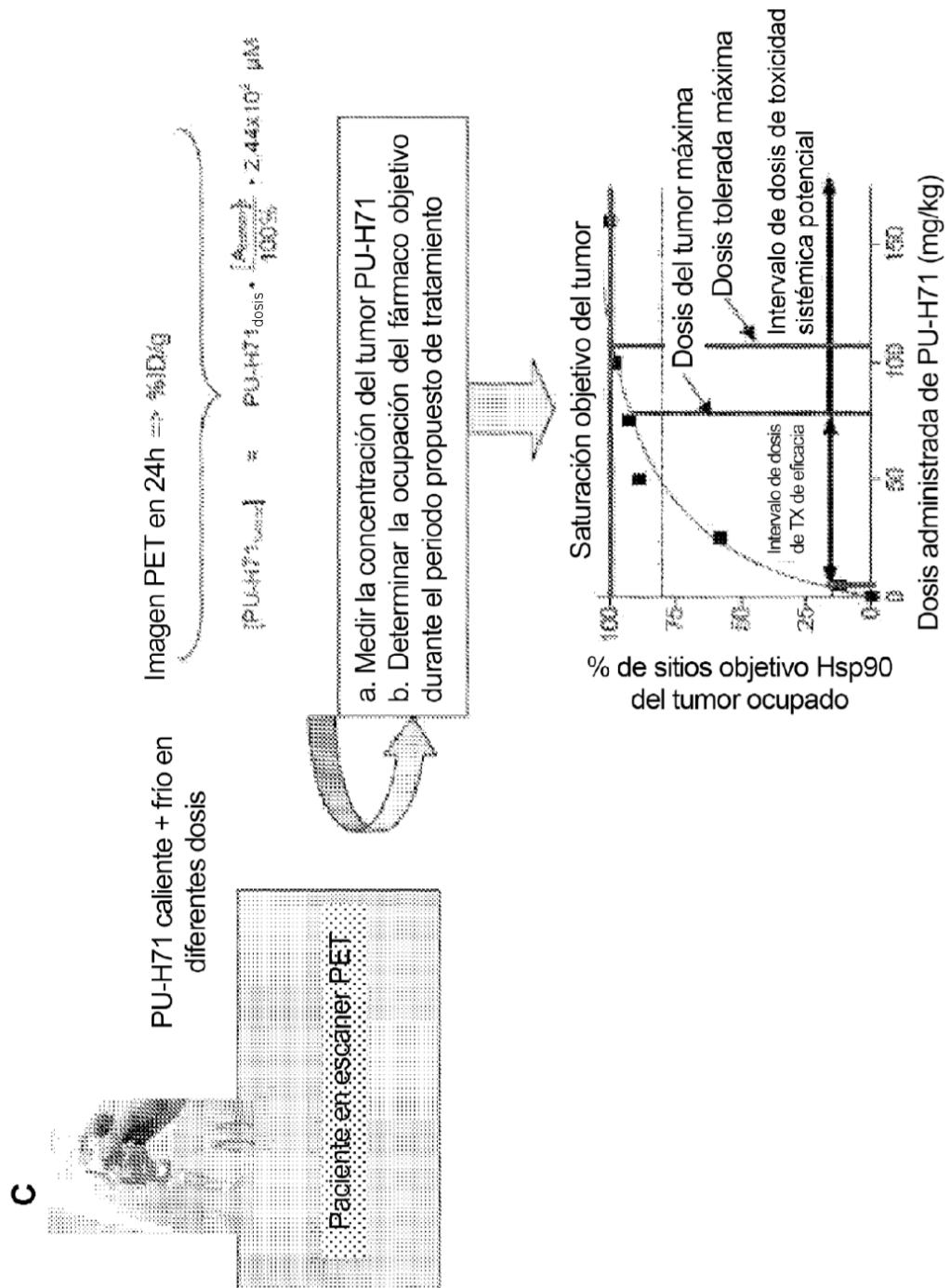


FIGURA 37a-c

a**b****FIGURA 38a-b**

**FIGURA 38C**

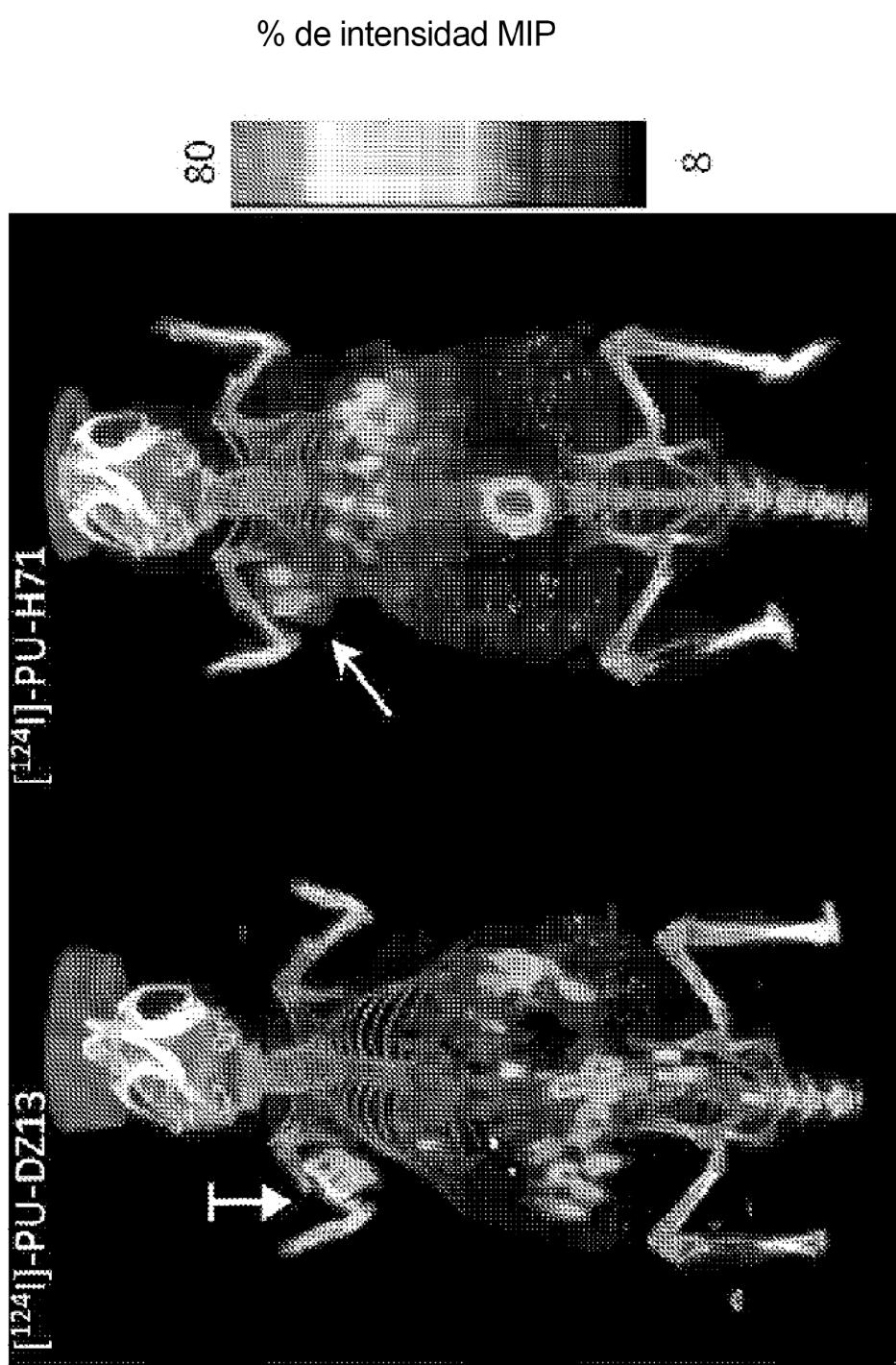


Figura 39

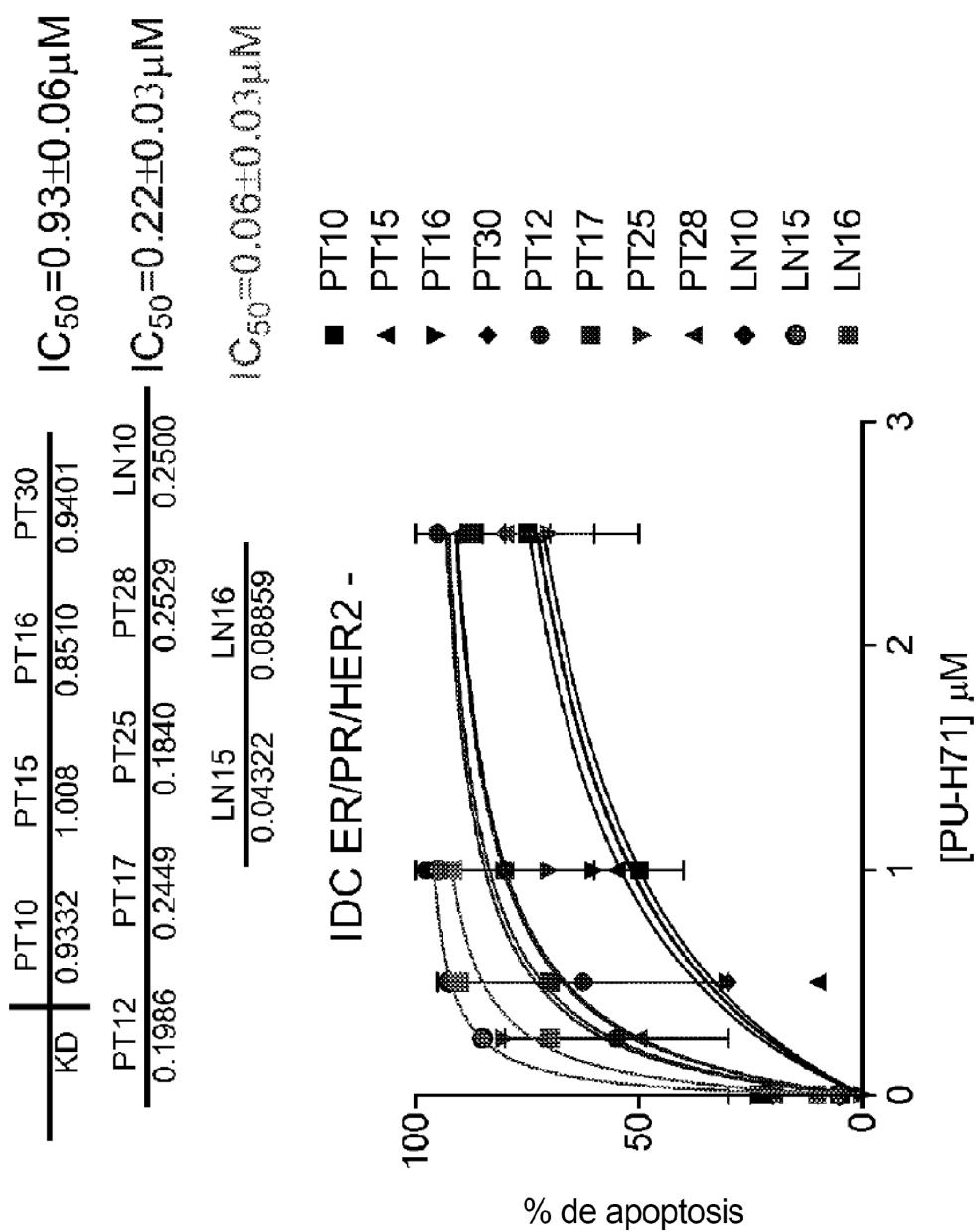
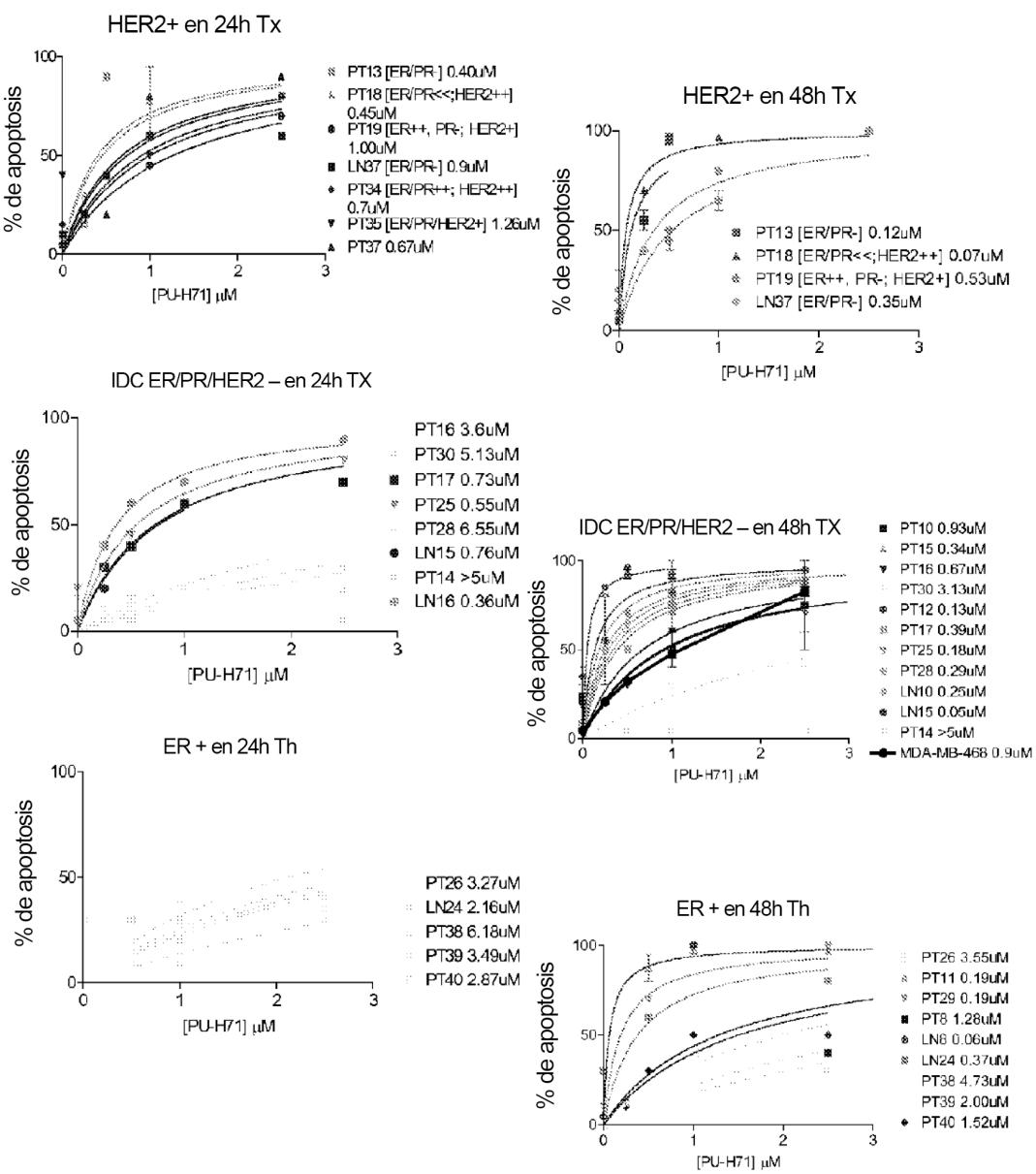


Figura 40A

B.**Figura 40B**

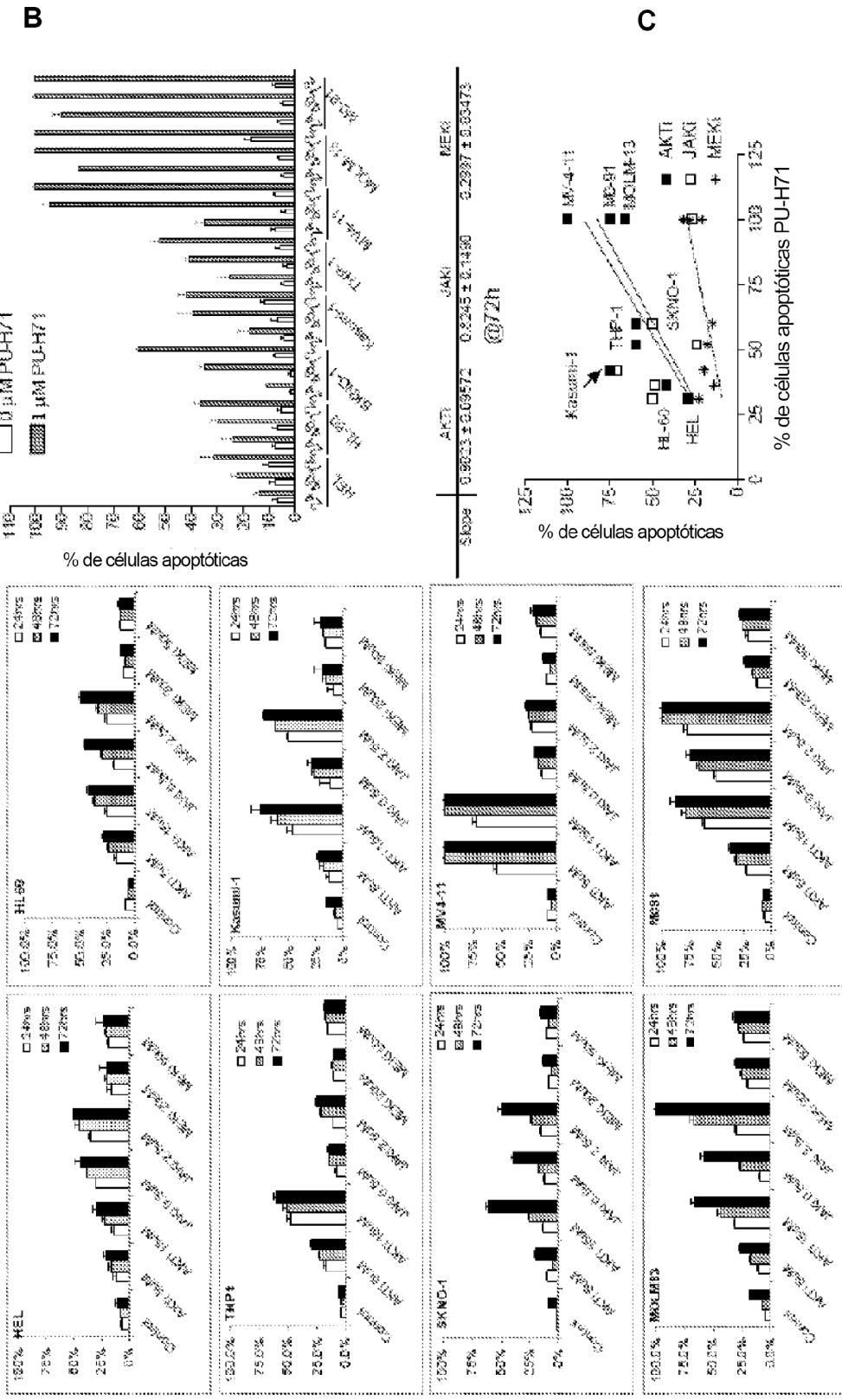


FIGURA 41 A-C

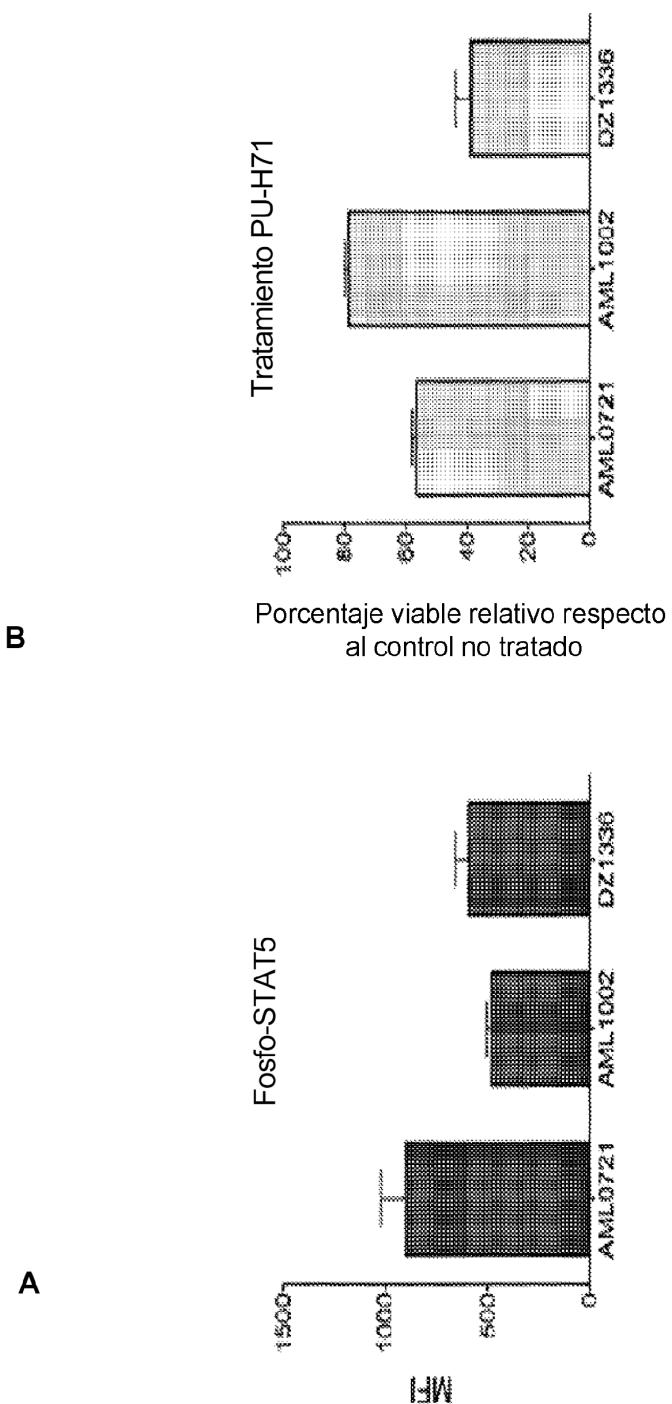
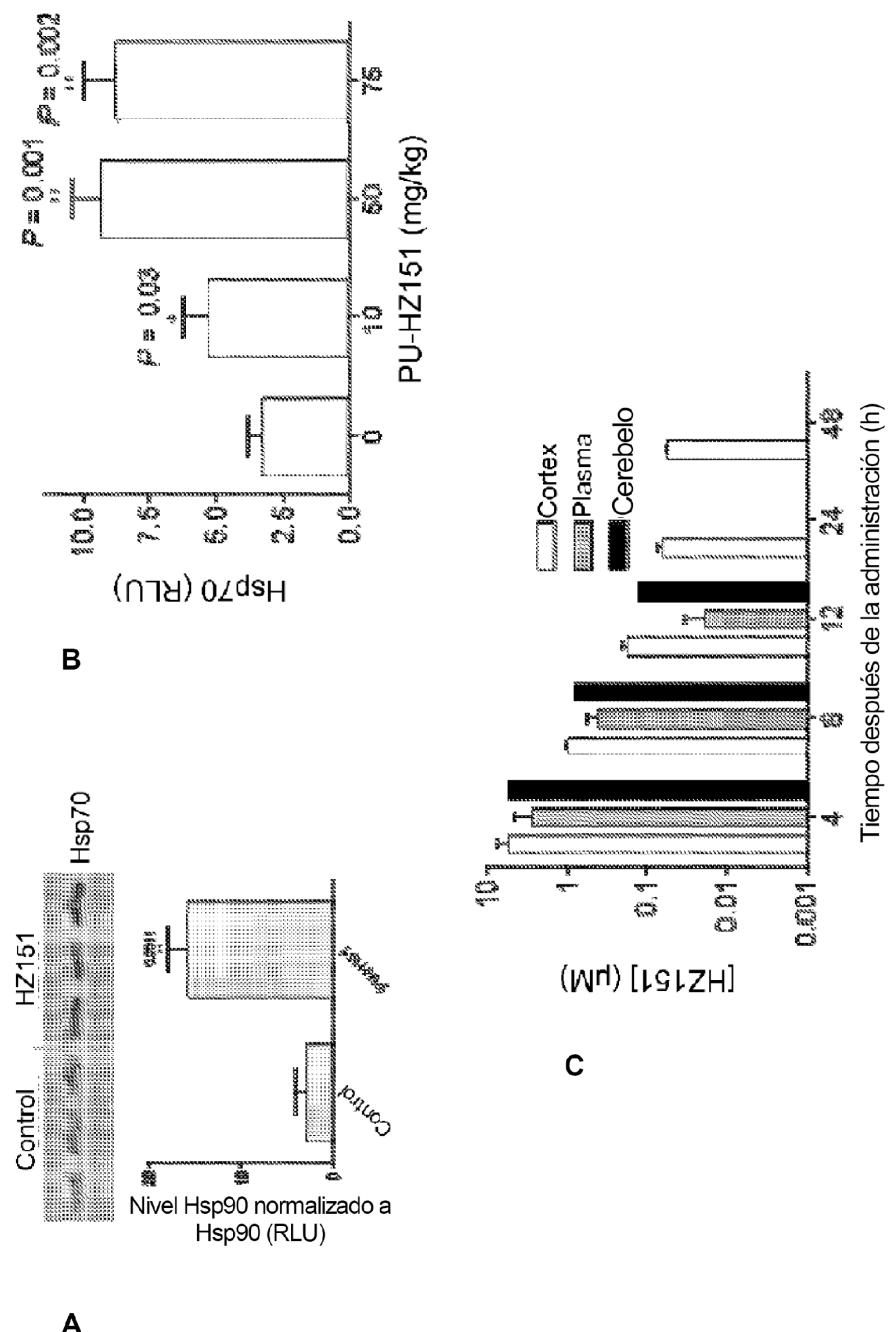
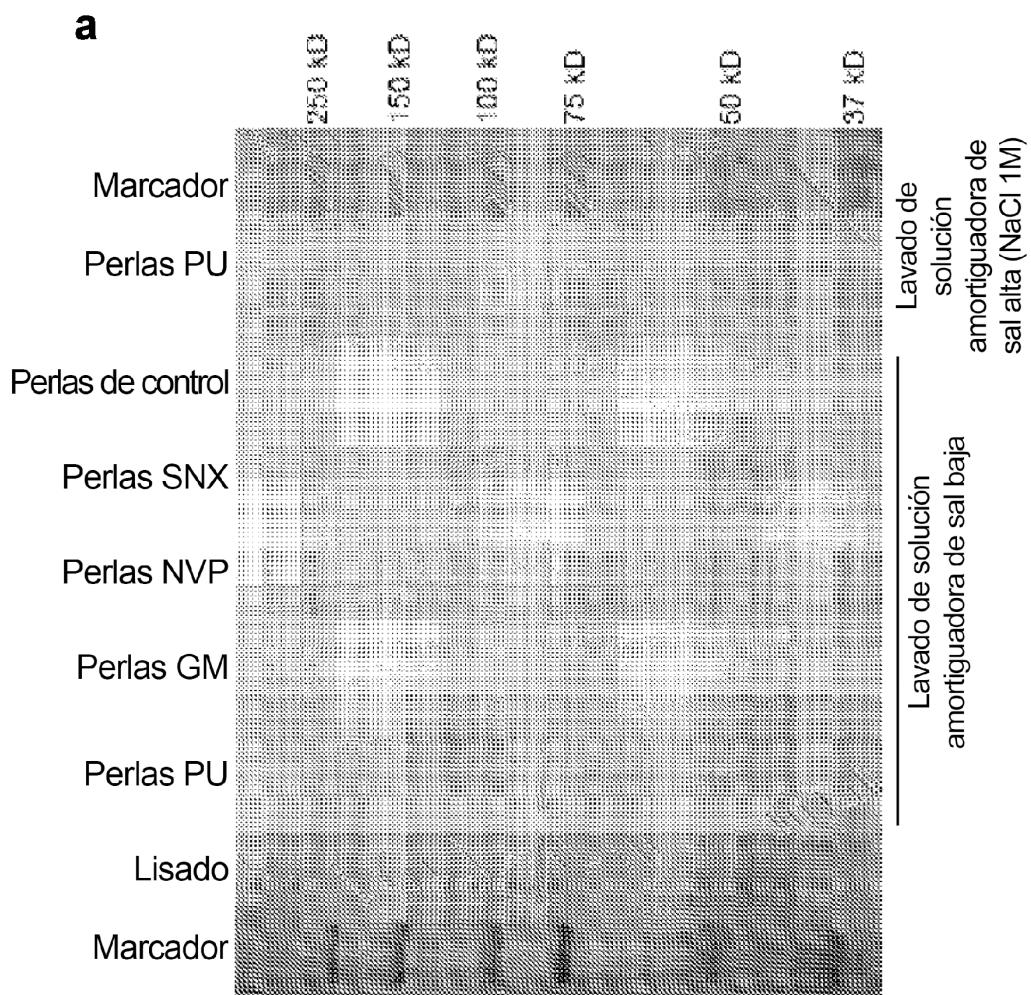


FIGURA 42A-B

**FIGURA 43A-C**

**FIGURA 44A**

