

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 682**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7064 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2005** E 12197499 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017** EP 2574341

54 Título: **Tratamiento efectivo de tumores y cáncer con fosfato de triciribina**

30 Prioridad:

29.03.2004 US 557599 P

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

14.08.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTH FLORIDA (100.0%)
3702 Spectrum Blvd, Suite 155
Tampa, FL 33612, US**

72 Inventor/es:

**CHENG, JIN Q. y
SEBTI, SAID M.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 629 682 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento efectivo de tumores y cáncer con fosfato de triciribina

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional Estadounidense No. 60/557,599, presentada el 29 de marzo de 2004.

10 Campo técnico

Esta solicitud proporciona regímenes terapéuticos particulares de fosfato de triciribina y composiciones con toxicidad reducida para el tratamiento de tumores, y cáncer.

15 Antecedentes

20 El cáncer es un crecimiento anormal de células. Las células de cáncer se reproducen rápidamente a pesar de la restricción de espacio, nutrientes compartidos por otras células, o señales enviadas desde el cuerpo para detener la reproducción. Las células de cáncer a menudo tienen una forma diferente a las células sanas, no funcionan adecuadamente, y se pueden propagar en muchas áreas del cuerpo. Los crecimientos anormales de tejido, llamados tumores, son grupos de células que son capaces de crecer y dividirse de manera incontrolable. Los tumores pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Los tumores benignos tienden a crecer lentamente y no se propagan. Los tumores malignos pueden crecer rápidamente, invadir y destruir los tejidos normales adyacentes, y propagarse por todo el cuerpo.

25 Los cánceres se clasifican de acuerdo con el tipo de fluido o tejido del que se originan, o de acuerdo con la ubicación en el cuerpo donde se desarrollaron por primera vez. Adicionalmente, algunos tipos de cáncer son de tipo mixto. Los cánceres se pueden agrupar en cinco grandes categorías, carcinomas, sarcomas, linfomas, leucemias y mielomas, que indican las clasificaciones del cáncer en tejidos y sangre. Los carcinomas son cánceres que se encuentran en el tejido corporal conocido como el tejido epitelial que cubre o reviste las superficies de los órganos, glándulas, o estructuras corporales. Por ejemplo, un cáncer del revestimiento del estómago se llama un carcinoma. Muchos carcinomas afectan a los órganos o glándulas que están involucrados con la secreción, tales como los senos que producen leche. Los carcinomas representan aproximadamente el ochenta a noventa por ciento de todos los casos de cáncer. Los sarcomas son tumores malignos que crecen de los tejidos conjuntivos, tales como cartílago, grasa, músculo, tendones y huesos. El sarcoma más común, un tumor en el hueso, usualmente ocurre en adultos jóvenes. Ejemplos de sarcoma incluyen osteosarcoma (hueso) y condrosarcoma (cartílago). El linfoma se refiere a un cáncer que se origina en los nodos o glándulas del sistema linfático, cuyo trabajo es producir células blancas de la sangre y fluidos corporales limpios, o en órganos tales como el cerebro y mama. Los linfomas se clasifican en dos categorías: linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin. La leucemia, también conocida como cáncer de sangre, es un cáncer de la médula ósea que retiene la médula ósea de producir células y plaquetas de sangre roja y blanca normales. Las células blancas de sangre son necesarias para resistir la infección. Las células rojas de sangre son necesarias para prevenir la anemia. Las plaquetas conservan fácilmente al cuerpo libre de hematomas y sangrado. Ejemplos de leucemia incluyen leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica aguda, y leucemia linfocítica crónica. Los términos mielóide y linfocítica indican el tipo de células que están involucradas. Finalmente, los mielomas crecen en las células plasmáticas de la médula ósea. En algunos casos, las células de mieloma se acumulan en un hueso y forman un tumor único, llamado plasmocitoma. Sin embargo, en otros casos, las células de mieloma se acumulan en muchos huesos, formando muchos tumores óseos. Esto se conoce como mieloma múltiple.

50 La inducción y progresión del tumor a menudo son el resultado de cambios acumulados en el genoma de la célula de tumor. Dichos cambios pueden incluir la inactivación de genes que inhiben el crecimiento celular, o genes supresores de tumor, así como la activación de genes u oncogenes que promueven el crecimiento de células. Se han identificado cientos de oncogenes celulares activados hasta la fecha en modelos animales, sin embargo, sólo una pequeña minoría de estos genes han demostrado ser importantes para los cánceres humanos (Weinberg et al 1989 Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer Cold Spring Harbor, NY, Stanbridge and Nowell 1990 Cell 63 867-874, Godwin et al 1992 Oncogenes and antioncogenes in gynecological malignancies. In WJ Hoskins, CA Perez and RC Young (eds), Gynecological oncology: principles and practice, pp 87-116, Lippincott, Filadelfia). La activación de oncogenes en los cánceres humanos puede resultar de factores tales como el aumento del número de copias del gen o cambios estructurales. Estos factores pueden provocar numerosos efectos celulares, por ejemplo, pueden dar lugar a sobreexpresión de un producto génico. Se pueden activar diversos oncogenes implicados en el cáncer humano a través de sobreexpresión de genes.

65 Se ha hecho evidente que las aberraciones genéticas sucesivas adquiridas por las células de cáncer resultan en defectos en los circuitos de transducción de señales reguladoras que regulan la proliferación normal de las células, diferenciación y muerte celular programada (Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Cell, 2000, 100(1): p. 57-700). Esto a su vez resulta en defectos fundamentales en la fisiología celular que dictan malignidad. Estos defectos incluyen: a) autosuficiencia en las señales de crecimiento (es decir, sobreexpresión de tirosina quinasas receptoras del factor de

crecimiento tales como EGFR y activación aberrante de las rutas de transducción de señal en dirección 3' tales como Ras/Raf/Mek/Erk $\frac{1}{2}$ y Ras/PI3K/Akt), b) resistencia a las señales de anti-crecimiento (es decir, inferior expresión de TGF β y su receptor), c) evadir la apoptosis (es decir, la pérdida de p53 proapoptótico; sobreexpresión de pro-supervivencia Bcl-2; hiperactivación de las rutas de supervivencia tales como las mediadas por PI3K/Akt), d) angiogénesis sostenida (es decir, altos niveles de secreción de VEGF) y f) invasión y metástasis de tejido (es decir, proteasas extracelulares e integrinas prometastásicas) (Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Cell, 2000. 100(1): p. 57-700).

Las tirosina quinasas receptoras tales como EGFR, ErbB2, VEGFR y factor de crecimiento similar a la insulina I receptor (IGF-1R) están íntimamente involucradas en el desarrollo de muchos cánceres humanos que incluyen cánceres pancreático, colorrectal, de mama y de ovario (Khaleghpour, K., et al. Carcinogenesis, 2004. 25(2): p. 241-8.; Sekharam, M., et al., Cancer Res, 2003. 63(22): p. 7708-16). La unión de ligandos tales como EGF, VEGF y IGF-1 a sus receptores promueve la estimulación de la actividad intrínseca de tirosina quinasa, autofosforilación de tirosinas específicas en el dominio citoplásmico de los receptores y reclutamiento de proteínas de señalización que activan una variedad de rutas de transducción de señal complejas Olayioye, M.A., et al., Embo J, 2000. 19(13): p. 3159-67, Porter, A.C. and R.R. Vaillancourt, Oncogene, 1998. 17(11 Reviews): p. 1343-52). Estas a su vez conducen a la activación de muchas rutas de supervivencia de tumor y oncogénicas tales como las rutas Ras/Raf/Mek/Erk $\frac{1}{2}$, JAK/STAT3 y de PI3K/Akt. Aunque se han implicado las tres rutas en la oncogénesis de colon, páncreas, mama y de ovario, aquellas que están mediadas por Akt han mostrado ser cruciales en muchas etapas de la transformación maligna, que incluyen proliferación celular, anti-apoptosis/supervivencia, invasión y metástasis y angiogénesis (Datta, S.R. et al. Genes Dev, 1999. 13(22): p. 2905-27).

La Akt es una proteína serina/treonina quinasa (también conocida como PK β), que tiene 3 miembros de la familia Akt1, Akt2 y Akt3. La estimulación de las células con factores de crecimiento o supervivencia resulta en el reclutamiento a los receptores de la quinasa quinasa fosfoinositida-3-OH-quinasa de lípido (PI3K), que fosforila fosfoinositol-4,5-bisfosfato (PIP $_2$) a PIP $_3$ que recluta Akt a la membrana plasmática donde puede ser activada mediante fosforilación sobre Thr308 y Ser473 (Akt1), Thr308 y Ser474 (Akt2) y Thr308 y Ser472 (Akt3) (Datta, S.R. et al. Genes Dev, 1999. 13(22): p. 2905-27). Por lo tanto, la PI3K activa la Akt al fosforilar PIP $_2$ y convertirla a PIP $_3$. La fosfatasa PTEN desfosforila PIP $_3$ a PIP $_2$ y por lo tanto impide la activación de Akt.

La mayoría de los cánceres humanos contienen Akt hiperactivada (Datta, S.R. et al. Genes Dev, 1999. 13(22): p. 2905-27, Bellacosa, A., et al., Int J Cancer, 1995. 64(4): p. 280-5; Sun, M., et al., Am J Pathol, 2001. 159(2): p. 431-7). En particular, la Akt se sobreexpresa y/o hiperactiva en 57%, 32%, 27% y 36% de cánceres colorrectal, pancreático, de mama y de ovario humano, respectivamente (Roy, H.K., et al. Carcinogenesis, 2002. 23(1): p. 201-5., Altomare, D.A., et al., J Cell Biochem, 2003. 88(1): p. 470-6., Sun, M., et al., Cancer Res, 2001. 61(16): p. 5985-91., Stal, O., et al. Breast Cancer Res, 2003. 5(2): p. R37-44, Cheng, J.Q., et al., Proc Natl Acad Sci utiliza, 1992. 89(19): p. 9267-71, Yuan, Z.Q., et al., Oncogene, 2000. 19(19): p. 2324-30). La hiperactivación de Akt se debe a la amplificación y/o sobreexpresión de Akt en sí mismo, así como a alteraciones genéticas en dirección 5' de Akt que incluyen la sobreexpresión de tirosina quinasas receptoras y/o sus ligandos (Khaleghpour, K., et al. Carcinogenesis, 2004. 25(2): p. 241-8.; Sekharam, M., et al., Cancer Res, 2003. 63(22): p. 7708-16, Cohen, B.D., et al., Biochem Soc Symp, 1998. 63: p. 199-210., Muller, W.J., et al. Biochem Soc Symp, 1998. 63: p. 149-57, Miller, W.E., et al. J Virol, 1995. 69(7): p. 4390-8, Slamon, D.J., et al., Science, 1987. 235(4785): p. 177-82, Andrulis, I.L., et al., J Clin Oncol, 1998. 16(4): p. 1340-9) y la supresión de la fosfatasa PTEN. Se ha demostrado preclínicamente la prueba del concepto de la implicación de Akt en la oncogénesis al mostrar que la expresión ectópica de Akt induce la transformación maligna y promueve la supervivencia celular (Sun, M., et al. Am J Pathol, 2001. 159(2): p. 431-7, Cheng, J.Q., et al., Oncogene, 1997. 14(23): p. 2793-801) y que la interrupción de las rutas de Akt inhibe el crecimiento celular e induce la apoptosis (Jetzt, A., et al. Cancer Res, 2003. 63(20): p. 6697-706).

La triciribina ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de tumor o cáncer con nivel elevado de Akt (Cancer Research, 64, 2004, páginas 4394-4399).

Los tratamientos actuales contra el cáncer y enfermedades relacionadas tienen efectividad limitada y numerosos efectos secundarios no deseados graves. A pesar de la efectividad clínica demostrada de muchos fármacos contra el cáncer, la toxicidad sistémica grave a menudo impide el desarrollo clínico de agentes quimioterapéuticos prometedores. Adicionalmente, la sobreexpresión de tirosina quinasas receptoras tales como EGFR y sus ligandos, tales como IGF-1, la sobreexpresión de Akt y/o pérdida de PTEN (todos los cuales resultan en hiperactivación de Akt) se asocian con un mal pronóstico, resistencia a quimioterapia y tiempo de supervivencia corto de los pacientes con cáncer. Las estrategias de investigación actuales enfatizan la búsqueda de modos terapéuticos eficaces con menos riesgo.

Triciribina

La acción anticancerígena de triciribina (TCN, NSC-154202, 3-amino-1,5-dihidro-5-metil-1- β -ribofuranosil-1,4,5,6,8-pentaazaacenafileno) y su éster de 5'-fosfato, fosfato de triciribina (TCN-P, NSC-280594) se identificó inicialmente en la década de 1970 (Townsend & Milne (1975) Ann NY Acad Sci, 255: 92-103). La TCN-P era la entidad química avanzada en ensayos clínicos porque era más soluble que el fármaco original. A principios de los años ochenta, la

TCN-P había mostrado actividad preclínica contra leucemias y carcinomas. A principios de los años ochenta, la TCN-P había sido identificada como un inhibidor de ADN, ARN y síntesis de proteínas, lo que demuestra la selectividad hacia las células en la fase S del ciclo celular (Roti- Roti et al. 1978 Proc Am Assoc Cancer Res and ASCO 19:40). También se ha propuesto que a diferencia de otros agentes antitumorales de nucleósidos en el momento, la TCN-P no es fosforilada más allá del nivel del monofosfato y no se incorpora en polinucleótidos (Bennett et al 1978 Biochem Pharmacol 27: 233-241, Plagemann JNCI 1976 57: 1283-1295). También se estableció que in vivo, la TCN-P se desfosforila a TCN mediante una enzima de plasma y mediante ecto-5'-nucleotidasa celular. Dentro de las células, la TCN se puede refosforila a TCN-P mediante la adenosina quinasa (Wotring et al 1981 Proc Am Assoc Cancer Res 22: 257, Basseches et al J Chromatogr 1982 233: 227-234).

En 1982, la TCN-P se introdujo en la Fase I de ensayos clínicos por Mittelman y colegas en veinte pacientes con tumores malignos avanzados resistentes Mittelman et al. 1983 Cancer Treat Rep 67: 159-162). La TCN-P se administró como una infusión intravenosa (iv) durante quince minutos una vez cada tres semanas en dosis de 25 a 350 mg/m². Los pacientes en el estudio fueron diagnosticados con cáncer de mama, de cabeza/cuello, pulmón, páncreas, tiroides, melanoma o cáncer indeterminado. Sólo se encontraron respuestas terapéuticas limitadas y fue evidente una toxicidad significativa. El grupo de Mittelman concluyó que no se justificaban ensayos clínicos adicionales que empleen su esquema de dosificación, pero instó a otros grupos para examinar los efectos de TCNP en ciertos tipos específicos de cáncer. También en 1983, Lu et al. (ASCO Abstracts, Farmacología Clínica, p 34 C-133) examinaron la farmacología clínica de TCN en los pacientes que recibieron 30-40 mg/m² por vía intravenosa mediante infusión continua durante cinco días. Lu et al. reportó que la TCN contribuyó a la toxicidad del hígado y la anemia y sugirió que los pacientes deben ser monitorizados para detectar estas toxicidades.

Cobb et al (Cancer Treat Reports 1983 67:173) informó de la actividad de TCN-P contra explantes quirúrgicos de tumores humanos en el ensayo de cápsula subrenal de seis días en ratones. Examinaron ochenta tipos de tumores que representaban mama, pulmón, colon, ovario y cuello uterino. Cobb et al informaron de que la TCN produce tasas de respuesta uniforme en los diferentes tumores, que van desde 21% (de mama) hasta 88% (cervical).

También se reportó otra Fase I por Feun et al. en 1984 (Cancer Research 44 (8) 3608-12). Feun et al administraron 10, 20, 30, y/o 40 mg/m² por vía intravenosa mediante infusión continua durante cinco días, cada tres a cuatro o seis semanas. Los pacientes en el estudio habían sido diagnosticados con cáncer de colon, sarcoma, melanoma, de pulmón o "otro" cáncer. Feun et al. reportó que se observó toxicidad significativa, que incluye hiperglucemia, hepatotoxicidad y trombocitopenia. Los autores recomendaron un esquema para la Fase II de ensayos clínicos de 20 mg/m² por día durante cinco días durante seis semanas y también se recomienda debido a la toxicidad que los pacientes deben ser estrechamente monitorizados para función hepática y pancreática, y que se deben excluir pacientes con diabetes, disfunción hepática o metástasis hepática masiva.

En 1986, Schilcher et al. (Cancer Research 1986 46: 3147-3151) reportó de los resultados de la evaluación Fase I de TCN-P utilizando un régimen intravenoso semanal. El estudio se realizó en veinticuatro pacientes con cánceres sólidos avanzados a través de una inyección intravenosa lenta durante cinco minutos en los días 1, 8, 15 y 22 de un ciclo de 42 días con un descanso de dos semanas. Se estudiaron cinco niveles de dosis de 12 a 96 mg/m² con 3 a 12 pacientes tratados en cada nivel con un total de 106 dosis administradas. Los pacientes en el estudio se han diagnosticado con cáncer de colon, recto, vejiga, suprarrenales, ovarios, páncreas, sarcoma, melanoma, pulmón u "otro" cáncer. Schilcher et al. concluyeron.

"Este esquema semanal produce toxicidad clínica inesperada y no se debe perseguir".

"En este momento nuestro grupo no recomienda llevar a cabo más estudios con TCN-P dada en esquemas semanales o intermitentes. Un futuro estudio de fase I-II, que utiliza un régimen diferente (por ejemplo, una sola aplicación una vez al mes) se podría reanudar si la TCN-P demuestra una pronunciada actividad in vitro contra tumores pancreático primario y hepáticos resistente terapéutico".

En 1986, Powis et al (Cancer Treatment Reports 70: 359-362) reportaron la disposición de la TCN-P en la sangre y el plasma de pacientes durante la Fase I y II de los ensayos clínicos. El ensayo de fase I emplea una dosis diaria de 24-55 mg/m² durante 5 días, mientras que el ensayo clínico de fase II emplea una dosis única de 250 mg/m². Powis et al no identificó una correlación entre los parámetros farmacocinéticos de TCN-P y la toxicidad de TCN-P.

A finales de 1980, principios de 1990, la TCN-P avanzó a la Fase II de los ensayos de metástasis de adenocarcinoma colorrectal, el cáncer de pulmón de células no microcíticas, carcinoma epidermoide denominado avanzado del cuello uterino y cáncer de mama metastásico. En 1987, O'Connell et al. (Cancer Treat Reports 71, No. 3, 333-34) publicó los resultados de un ensayo de Fase II en pacientes con adenocarcinoma colorrectal metastásico. A los pacientes se les administró 165 o 250 mg/m² de TCN-P iv durante 15 minutos una vez a la semana en intervalos de tres semanas. O'Connell et al. concluyeron que los ensayos muestran una falta de utilidad clínica de TCN-P en el tratamiento de pacientes con adenocarcinoma colorrectal metastásico. Adicionalmente, en 1991, Lyss, et al., (Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol, (1996) 15 A1151) reportaron los resultados preliminares de un ensayo de la administración de 35 mg/m² por día durante cinco días una vez cada seis semanas a los pacientes con cáncer de pulmón de células no microcíticas avanzado.

Feun et al. (Am J Clin Oncol 1993 16: 506-508) reportaron los resultados de un ensayo de fase II de TCN-P en pacientes con carcinoma de células epidermoides del cuello uterino avanzado. Una infusión continua de 5 días de por lo menos 35 mg/m² se repitió cada seis semanas. Entre los veintiún pacientes evaluables, se observaron sólo dos respuestas. Fuen et al. concluyeron que "la utilización de TCN-p en esta dosis y esquema, parece diezmar una actividad limitada en cáncer de cuello uterino de células epidermoides metastásico o recurrente".

En 1996, Hoffman et al (Cancer Chemother Pharmacol 37: 254-258) reportaron los resultados de un estudio de fase I-II de TCN-P para el cáncer de mama metastásico. En un estudio, catorce pacientes fueron tratados con 20 mg/m² por día a través de infusión continua durante cinco días cada seis semanas. Cuando los autores no observaron una respuesta a esta dosis, la dosis se aumentó a por lo menos 35 mg/m² utilizando el mismo esquema de 5 días de infusión continua. Hoffman et al concluyeron que "la TCN es inefectiva en todas las dosis ensayadas y en dosis mayores que o iguales a 35 mg/m² tiene efectos tóxicos inaceptables".

Por lo tanto, la combinación de efectividad limitada y toxicidad inaceptable impide el desarrollo clínico adicional de TCN-P y compuestos relacionados.

El documento WO 03/079748 otorgado a los Regentes de la Universidad de California describen ciertos inhibidores de ZNF217, tales como triciribina, en combinación con agentes quimioterapéuticos adicionales, tales como doxorubicin.

Es un objeto de la presente invención proporcionar la administración de fosfato de triciribina y composiciones con toxicidad reducida para el tratamiento de tumores, cáncer y otros trastornos asociados con la proliferación celular anormal.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar métodos mejorados para tratar tumores o cáncer en el sujeto con fosfato de triciribina.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona regímenes terapéuticos novedosos de fosfato de triciribina para tratar tumores o cáncer en un sujeto mientras que se limita la toxicidad sistémica. La invención se basa sobre el descubrimiento de que los tumores o cánceres que sobreexpresan quinasa Akt son particularmente sensibles a los efectos citotóxicos de TCN y los compuestos relacionados. Los inventores han determinado, contrario a la técnica anterior y experiencia, cómo utilizar con éxito triciribina para tratar tumores y cáncer mediante uno o una combinación de (i) administración de triciribina solo a pacientes que de acuerdo con una prueba de diagnóstico descrita adelante, exhiben sensibilidad mejorada al fármaco; (ii) uso de un nivel de dosificación descrito que minimiza la toxicidad de el fármaco pero aún así exhibe eficacia; o (iii) uso de un régimen de dosificación descrito que minimiza la toxicidad de el fármaco.

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan los métodos para identificar tumores y cánceres que sean particularmente susceptibles a los efectos tóxicos del TCN-P. En una realización, se proporcionan métodos para tratar un tumor en un mamífero, particularmente un humano, que incluye (i) obtener una muestra biológica del tumor; (ii) determinar si el tumor sobreexpresa una quinasa Akt, y (iii) tratar el tumor que sobreexpresa quinasa Akt con fosfato de triciribina.

En una realización, se puede determinar el nivel de expresión de quinasa Akt al ensayar el tumor o cáncer para presencia de una quinasa Akt fosforilada, por ejemplo, al utilizar un anticuerpo que puede detectar la forma fosforilada. En otra realización, el nivel de expresión Akt se puede determinar al ensayar una célula de tumor o cáncer obtenida de un sujeto y comparar los niveles a un tejido de control. En ciertas realizaciones, la Akt se puede sobreexpresar por lo menos 2, 2.5, 3 o 5 veces en la muestra de cáncer comparada con el control. En ciertas realizaciones, la quinasa Akt sobreexpresada puede ser una quinasa Akt hiperactivada y fosforilada.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan regímenes de dosificación que limitan los efectos secundarios tóxicos del fosfato de TCN. En una realización, dichos regímenes de dosificación minimizan o eliminan los efectos secundarios tóxicos, que incluyen, hepatotoxicidad, trombocitopenia, hiperglicemia, vómito, hipocalcemia, anemia, hipoalbumemia, mielosupresión, hipertrigliceridemia, hiperamilasemia, diarrea, estomatitis y/o fiebre. En otra realización, la administración de TCN-P proporciona por lo menos una respuesta parcial, tal como por lo menos 15, 20 o 30%, o respuesta completa in vivo en por lo menos 15, 20, o 25% de los sujetos.

En una realización, se proporciona un tratamiento para un sujeto que se ha diagnosticado con un tumor al administrar al sujeto una cantidad efectiva de TCN-P de acuerdo con un esquema de dosificación que incluye administrar el fármaco aproximadamente una vez por semana durante aproximadamente tres semanas seguido por un periodo de una semana en el que no se administra el fármaco. En otra realización, se proporcionan tratamientos de un tumor o cáncer en un sujeto al administrar al sujeto un régimen de dosificación de 10 mg/m² o menos de TCN-P una vez por semana. En una realización, el compuesto se puede administrar como una dosis de único bolo durante un corto periodo de tiempo, por ejemplo, aproximadamente 5, 10 o 15 minutos. En realizaciones adicionales, se proporcionan esquemas de dosificación en los que los compuestos se administran a través de infusión continua

durante por lo menos 24, 48, 72, 96, o 120 horas. En ciertas realizaciones, la administración continua se puede repetir por lo menos una vez una semana, una vez cada dos semanas y/o una vez un mes. En otras realizaciones, los compuestos se pueden administrar por lo menos una vez cada tres semanas. En realizaciones adicionales, los compuestos se pueden administrar por lo menos una vez al día durante por lo menos 2, 3, 4 o 5 días.

En realizaciones adicionales, se puede administrar TCN-P a pacientes en una cantidad que es efectiva en provocar regresión de tumor. La administración de TCN-P puede proporcionar por lo menos una respuesta parcial, tal como por lo menos 15, 20 o 30%, o respuesta completa in vivo en por lo menos 15-20% de los sujetos. En ciertas realizaciones, por lo menos 2, 5, 10, 15, 20, 30 o 50 mg/m² de un compuesto divulgado aquí se puede administrar a un sujeto. La administración del compuesto se puede realizar de acuerdo con cualquiera de los regímenes terapéuticos divulgados aquí. En realizaciones particulares, el régimen de dosificación puede incluir administrar menos de 20 mg/m² de TCN-P. En una realización, menos de 10 mg/m² de TCN-P se puede administrar una vez una semana. En realizaciones adicionales, dosificaciones de o menos de 2 mg/m², 5 mg/m², 10 mg/m², y/o 15 mg/m² de TCN-P se puede administrar a un sujeto. En otra realización, menos de 10 mg/m² se puede administrar a un sujeto a través de infusión continua durante por lo menos cinco días. En realizaciones particulares, se puede utilizar TCN-P para el tratamiento de pancreático, cáncer de próstata, colorrectal y/o de ovario.

En una realización, se pueden utilizar los compuestos y/o regímenes terapéuticos de la presente invención para evitar y/o tratar un carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, y/o mieloma. En otras realizaciones de la presente invención, se pueden utilizar los compuestos divulgados aquí para tratar tumores sólidos. En realizaciones aún adicionales, se pueden utilizar los compuestos y composiciones divulgadas aquí para el tratamiento de un tumor o cáncer, tal como, para cáncer de los siguientes órganos o tejidos: mama, próstata, hueso, pulmón, colon, que incluyen pero no se limitan a colorrectal, urinario, vejiga, linfoma no Hodgkin, melanoma, riñón, renal, páncreas, faringe, tiroides, estómago, cerebro, y/o ovarios. En realizaciones particulares, se puede utilizar TCN-P para el tratamiento de cáncer pancreático, de mama, colorrectal y/o de ovario. En realizaciones adicionales de la presente invención, se pueden utilizar los compuestos divulgados aquí en el tratamiento de enfermedades relacionadas con angiogénesis. En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar leucemia a través infusión continua de TCN-P mediante infusión continua durante por lo menos 24, 48, 72 o 96 horas. En otras realizaciones, se puede repetir la infusión continua, por ejemplo, por lo menos una vez cada dos, tres o cuatro semanas.

En una realización particular, se proporciona un tratamiento de tumores, cáncer, y otros trastornos asociados con una proliferación celular anormal en un anfitrión, el tratamiento comprende administrar al anfitrión una cantidad efectiva de un compuesto divulgado aquí opcionalmente en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, los compuestos y composiciones se pueden administrar en combinación o alternación con por lo menos un agente quimioterapéutico adicional. Los fármacos pueden formar parte de la misma composición, o se puede proporcionar como una composición separada para administración al mismo tiempo o un tiempo diferente. En una realización, las composiciones de la invención se pueden combinar con agentes antiangiogénicos. En otras realizaciones de la presente invención, se pueden utilizar los compuestos y composiciones divulgadas aquí en combinación o alternación con los siguientes tipos de fármacos, que incluyen, fármacos antiproliferativos, agentes antimetabólicos, fármacos antimetabolitos, agentes alquilantes o mostazas de nitrógeno, fármacos que se dirigen a topoisomerasas, fármacos que se dirigen a transducción de señales en células de tumor, terapia génica y agentes antisentido, productos terapéuticos de anticuerpo, esteroides, análogos de esteroides, fármacos antieméticos y/o agentes no esteroides.

En otras realizaciones, se puede utilizar TCN-P para tratar tumores o cánceres resistentes a uno o más fármacos, que incluyen las realizaciones de tumores o cánceres y fármacos divulgados aquí. En una realización, la TCN-P se administra en una cantidad efectiva para el tratamiento de un paciente con un tumor o cáncer resistente a fármaco, por ejemplo, tumores o cáncer resistentes a múltiples fármacos, que incluyen aquellos resistentes a taxol, rapamicina, tamoxifen, cisplatino, y/ o gefitinib (iressa). En una realización, la TCN-P se puede administrar con un agente quimioterapéutico adicional que puede ser un inhibidor de P-glicoproteína, tal como verapamilo, ciclosporina (tal como ciclosporina A), tamoxifen, antagonistas de calmodulina, dexverapamilo, dexniguldipina, valsopodar (PSC 833), biricodar (VX-710), tariquidar (XR9576), zosuquidar (LY335979), laniquidar (R101933), y/o ONT-093.

En ciertas realizaciones, se proporciona un tratamiento que incluye administrar a un anfitrión en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un compuesto divulgado aquí, o composición farmacéutica que comprende el compuesto, en una cantidad efectiva para el tratamiento de tumores cáncer.

En una realización, se proporciona un tratamiento de un tumor o cáncer que incluye una cantidad efectiva de un compuesto divulgado aquí, o una sal, del mismo, a un individuo en necesidad del mismo, en el que el cáncer es por ejemplo, carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, o mieloma. El compuesto, o sal del mismo, opcionalmente se proporciona en una composición farmacéuticamente aceptable que incluye los portadores adecuados, tales como agua, que se formula para la ruta deseada de administración a un individuo en necesidad del mismo. Opcionalmente el compuesto se administra en combinación o alternación con por lo menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento de tumores o cáncer.

También dentro del alcance de la invención está el uso de un compuesto divulgado aquí o una sal del mismo en el tratamiento de un tumor o cáncer, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable; y el uso de un compuesto divulgado aquí o una sal del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer o tumor, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable.

5

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 demuestra la identificación de API-2 (tricitribina) como un candidato de inhibidor de Akt del Grupo de Diversidad NCI. A ilustra la estructura química de API-2 (tricitribina). B demuestra que la API-2 inhibe los niveles de fosforilación de AKT2 en células NIH3T3 transformadas por AKT2. Mientras que las células del tipo NIH3T3 transformadas por AKT2 se trataron con API-2 (1 μ M) durante las veces indicadas y se sometieron a análisis de inmunotransferencia con anticuerpo anti-fosfo-Akt-T308 y -S473 (paneles superior y medio). El panel inferior muestra expresión de AKT2 total. En C, se muestra que API-2 inhibe tres isoformas de Akt. Se transfectan células HEK293 con HA-Akt1, -AKT2 y -AKT3 y se tratan con API-2 (1 μ M) o wortmanina (15 μ M) antes de estimulación con EGF, las células se lisaron e inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-HA. Los inmunoprecipitados se sometieron a ensayo de quinasa in vitro (superior) y análisis de inmunotransferencia con anticuerpo anti-fosfo-Akt-T308 (inferior). El panel de la mitad muestra expresión de Akt, AKT2 y AKT3 transfectada. D ilustra que API-2 no inhibe Akt in vitro. Ensayo de quinasa in vitro de la proteína recombinante de AKT2 constitutivamente activa en un regulador de quinasa que contiene 1 μ M de API-2 (lane 3).

20

La Figura 2 demuestra que la API-2 no inhibe PI3K, PDK1 y los elementos cercanamente relacionados de la familia de quinasas AGC. A demuestra un ensayo de quinasa PI3K in vitro. Las células HEK293 se privaron de suero y se trataron con API-2 (1 μ M) o wortmanina (15 μ M) durante 30 minutos antes de estimulación con EGF. Las células se lisaron e inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-p110 α . Se sometieron los inmunoprecipitados a ensayo de quinasa in vitro utilizando PI-4-P como sustrato. B ilustra el efecto de API-2 sobre activación de PDK1 in vitro (panel superior), los círculos cerrados muestran inhibición mediante API-2. Los círculos abiertos muestran inhibición por la estaurosporina de control positivo, que es un inhibidor de PDK1 potente (IC₅₀ = 5 nM). Los paneles inferiores son análisis de inmunotransferencia de células HEK293 que se transfectan con Myc-PDK1 y se tratan con wortmanina o API-2 antes de estimulación con EGF. Se detectan las inmunotransferencias con anticuerpos indicados. C ilustra un análisis de niveles de fosforilación de PKC α con anticuerpos anti-fosfo-PKC α -T638 (superior) y PKC α total (inferior) luego de tratamiento con API-2 o un inhibidor PKC no selectivo Ro31-8220. D muestra un ensayo de quinasa SGK in vitro. Las células HEK293 se transfectan con HA-SGK y se tratan con API-2 o wortmanina antes de estimulación con EGF. Se desarrolla quinasa in vitro con inmunoprecipitados HA-SGK utilizando MBP como sustrato (superior). El panel inferior muestra la expresión de HA-SGK transfectado. E ilustra los resultados de un ensayo de quinasa PKA. Se incubó PKA inmunitpurificado en regulador ADB (Upstate Biotechnology Inc) que contiene los inhibidores indicados (API-2 o PKAI) y el sustrato Kempide. La actividad de quinasa se cuantificó. En F, se muestra una inmunotransferencia. Se trataron células OVCAR3 con API-2 durante las veces indicadas. Se inmunotrasfirieron los lisatos celulares con los anti-fosfo-anticuerpos indicados (paneles 1-4) y anticuerpo anti-actina (inferior).

La Figura 3 demuestra que API-2 inhibe actividad Akt y crecimiento celular e induce apoptosis en células de cáncer humanas con Akt elevada. A es una inmunotransferencia, luego de tratamiento con API-2, se detectan niveles de fosforilación de Akt con anticuerpo anti-fosfo-Akt-T308 en las estirpes de células de cáncer humanas. Las transferencias se volvieron a sondear con anticuerpo Akt anti-total (paneles inferiores). En B, se muestra un ensayo de proliferación celular. Las estirpes celulares como se indican en la Figura se trataron con diferentes dosis de API-2 durante 24 h y 48 h y luego se analizan con kit de Ensayo de Proliferación de Células CellTiter 96 (Promega). C proporciona un análisis de apoptosis. Se trataron las células con API-2 y se tiñeron con annexina V y PI y se analizaron mediante FACScan.

La Figura 4 muestra que la API-2 inhibe objetivos en dirección 3' de Akt y exhibe actividad antitumoral en estirpes celulares de cáncer con Akt elevada en xenoinjerto de ratón. En A, se demuestra que la API-2 inhibe fosforilación Akt de tuberina, Bad, AFX y GSK-3 β . Luego de tratamiento con API-2, células OVAR3 se lisaron y se inmunotrasfirieron con los anticuerpos indicados. B muestra que la API-2 inhibe el crecimiento de tumor. Se inyectaron células de tumor por vía subcutánea en ratones sin pelo con bajo nivel de células Akt sobre el lado izquierdo y nivel elevado de células Akt sobre el lado derecho. Cuando los tumores alcanzan un tamaño promedio de aproximadamente 100-150 mm³, se trataron los animales con ya sea vehículo o 1 mg/kg/día de API-2. Cada medición representa un promedio de 10 tumores. C ilustra una representación de los ratones con xenoinjerto de OVCAR3 (derecha) y OVCAR5 (izquierda) tratado con API-2 o vehículo (control). D muestra ejemplos de tamaño (inferior) y peso (superior) de tumor al final del experimento. En E, se realiza análisis de inmunotransferencia de lisados de tumor con anticuerpos anti-fosfo-Akt-S473 (superior) y anti-AKT2 (inferior) en tumores derivados de OVCAR-3 que se trataron (T3 y T4) y no trataron (T1 y T2) con API-2.

La Figura 5 muestra que la API-2 (tricitribina) inhibe actividad Akt de quinasa in vitro. El ensayo de quinasa in vitro se realizó con recombinante de PDK1 y Akt en un regulador que contiene fosfatidilinositol-3,4,5-P3 (PIP3), API-2 e histona H2B como sustrato. Después de incubación de 30 min, las reacciones se separaron mediante SDS-PAGE y se expusieron en una película.

65

La Figura 6 proporciona el mARN y secuencia de aminoácidos de Akt1 humana, también se observaron sitios de enzima de restricción.

5 La Figura 7 proporciona el mARN y secuencia de aminoácidos de Akt2 humana también se observaron sitios de enzima de restricción.

La Figura 8 proporciona el mARN y secuencia de aminoácidos de Akt3 humana también se observaron sitios de enzima de restricción.

10 Descripción detallada

Los inventores han determinado, contrario a la técnica anterior y experiencia, cómo utilizar de forma exitosa fosfato de triciribina para tratar tumores y cáncer mediante una o una combinación de (i) administrar fosfato de triciribina solo a pacientes que de acuerdo con una prueba de diagnóstico descrita adelante, exhibir sensibilidad mejorada al fármaco; (ii) utilizar un nivel de dosificación descrito que minimiza la toxicidad de el fármaco pero aún así exhibe eficacia; o (iii) utilizar un régimen de dosificación descrito que minimiza la toxicidad de el fármaco.

I. Compuestos

20 La presente invención proporciona el uso de compuestos de TCN-P para uso en regímenes terapéuticos particulares para el tratamiento de trastornos proliferativos, cuya estructura se muestra en la reivindicación 1.

25 Se debe entender que el compuesto divulgado aquí puede contener centros quirales. Dichos centros quirales pueden tener cualquier configuración (R) o (S), o pueden ser una mezcla de las mismas. Por lo tanto, el compuesto proporcionado aquí puede ser enantioméricamente puro, o ser mezclas estereoisoméricas o diastereoméricas. Se entiende que la divulgación de un compuesto aquí abarca cualquier forma racémica, ópticamente activa, polimórfica, o estereoisomérica, o mezclas de las mismas, que posee preferiblemente las propiedades útiles descritas aquí, siendo bien conocido en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas y cómo determinar la actividad utilizando las pruebas estándar descritas aquí, o utilizando otras pruebas similares que se conocen en la técnica.

30 Ejemplos de métodos que se pueden utilizar para obtener isómeros ópticos de los compuestos incluyen los siguientes:

35 i) separación física de cristales - una técnica mediante la cual los cristales macroscópicos de los enantiómeros individuales se separan manualmente. Esta técnica se puede utilizar si existen cristales de los enantiómeros separados, es decir, el material es un conglomerado y los cristales son visualmente distintos;

ii) cristalización simultánea - una técnica mediante la cual los enantiómeros individuales se cristalizan separadamente a partir de una solución del racemato, posible sólo si éste es un conglomerado en el estado sólido;

40 iii) resoluciones enzimáticas - una técnica mediante la cual existe separación parcial o completa de un racemato en virtud de diferentes tasas de reacción para los enantiómeros con una síntesis enzimática;

45 iv) síntesis asimétrica enzimática - una técnica sintética por la cual por lo menos una etapa de la síntesis utiliza una reacción enzimática para obtener un precursor sintético enantioméricamente puro o enriquecido del enantiómero deseado;

50 v) síntesis asimétrica química - una técnica sintética mediante el cual el enantiómero deseado se sintetiza a partir de un precursor aquiral bajo condiciones que producen asimetría (es decir, quiralidad) en el producto, lo que se puede conseguir utilizando catalizadores quirales o auxiliares quirales;

55 vi) separaciones de un diastereómero - una técnica mediante la cual se hace reaccionar un compuesto racémico con un reactivo enantioméricamente puro (el auxiliar quiral) que convierte los enantiómeros individuales a diastereómeros. Los diastereómeros resultantes luego mediante cromatografía o cristalización en virtud de sus ahora más claras diferencias estructurales y el auxiliar quiral se elimina más tarde para obtener el enantiómero deseado;

60 vii) transformaciones asimétricas de primer y segundo orden - una técnica mediante la cual los diastereómeros a partir del racemato se equilibran para producir una preponderancia en solución del diastereómero a partir del enantiómero deseado o en el que la cristalización preferencial del diastereómero desde el enantiómero deseado perturba el equilibrio de tal manera que, eventualmente, en principio todo el material se convierte en el diastereómero cristalino a partir del enantiómero deseado. El enantiómero deseado luego se libera del diastereómero;

65 viii) resoluciones cinéticas - esta técnica se refiere al logro de resolución parcial o completa de un racemato (o de una resolución adicional de un compuesto parcialmente resuelto) en virtud de las velocidades de reacción desiguales de los enantiómeros con un reactivo quiral, no racémico o un catalizador bajo condiciones cinéticas;

ix) síntesis enantioespecífica de precursores no racémicos – una técnica sintética mediante la cual el enantiómero deseado se obtiene a partir de materiales de partida no quirales y donde la integridad estereoquímica no se compromete, o sólo se compromete mínimamente durante el curso de la síntesis;

5 x) cromatografía de líquido quiral – una técnica mediante la cual los enantiómeros de un racemato se separan en una fase móvil líquida en virtud de sus diferentes interacciones con una fase estacionaria. La fase estacionaria puede estar hecha de material quiral o la fase móvil puede contener un material quiral adicional para provocar las diferentes interacciones;

10 xi) cromatografía de gas quiral – una técnica mediante la cual el racemato se volatiliza y los enantiómeros se separan en virtud de sus diferentes interacciones en la fase móvil gaseosa con una columna que contiene una fase adsorbente quiral no racémica fija;

15 xii) extracción con solventes quirales – una técnica mediante la cual los enantiómeros se separan en virtud de la disolución preferencial de un enantiómero en un solvente quiral particular;

20 xiii) transporte a través de membranas quirales – una técnica mediante la cual un racemato se coloca en contacto con una barrera de membrana fina. La barrera normalmente separa dos fluidos miscibles, uno que contiene el racemato y una fuerza de accionamiento tales como concentración o presión diferencial que provoca transporte preferencial a través de la barrera de la membrana. La separación ocurre como resultado de la naturaleza quiral no racémica de la membrana que permite que solo pase a través un enantiómero del racemato.

En algunas realizaciones, se proporciona fosfato de triciribina (TCN-P). La TCN se puede sintetizar mediante cualquier técnica conocida por un experto en la técnica, por ejemplo, como se describe en Tetrahedron Letters, vol. 25 49, pp. 4757-4760 (1971). La TCN-P se puede preparar mediante cualquier técnica conocida para un experto en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,123,524. La síntesis de TCN-DMF se describe, por ejemplo, en INSERM, vol. 81, pp. 37-82 (1978). Otros compuestos relacionados con TCN tal como se describe aquí se pueden sintetizar, por ejemplo, de acuerdo con los métodos divulgados en Gudmundsson, K.S., et al., "Synthesis of carbocyclic analogs of 2',3'-dideoxysangivamycin, 2',3'-dideoxytoyocamycin, and 2',3'-dideoxytricyribine", Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 20(10-11):1823-1830 (Octubre-Noviembre 2001); Porcari, A.R., et al., "6-N-Acyltricyribine analogues: structure-activity relationship between acyl carbon chain length and activity against HIV-1", J. Med. Chem., 43(12):2457-2463 (June 15, 2000); Porcari, A.R., et al., "Acyclic sugar analogs of tricyribine: lack of antiviral and antiproliferative activity correlate with low intracellular phosphorylation", Nucleosides Nucleotides, 18(11-12):2475-2497 (November-December 1999), Porcari, A.R., et al., "Deoxy sugar analogues of tricyribine: correlation of antiviral and antiproliferative activity with intracellular phosphorylation", J. Med. Chem., 35 43(12):2438-2448 (June 15, 2000), Porcari, A.R., et al., "Synthesis and antiviral activity of 2-substituted analogs of tricyribine", Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 22(12):2171-2193 (December 2003), Porcari, A.R., et al., "An improved total synthesis of tricyribine: a tricyclic nucleoside with antineoplastic and antiviral properties", Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 23(1-2):31-39 (2004), Schweinsberg, P.D., et al. "Identification of the metabolites of an antitumor tricyclic nucleoside (NSC-154020)", Biochem. Pharmacol., 30(18):2521-2526 (September 15, 1981), Smith, K.L., et al., "Synthesis of new 2'-beta-C-methyl related tricyribine analogues as anti-HCV agents", Bioorg. Med. Chem. Lett., 14(13):3517-3520 (July 5, 2004), Townsend, L.B., et al., "The synthesis and biological activity of certain pentaazaacenaphthylenes, hexaazaacenaphthylenes and their corresponding nucleosides", Nucleic Acids Symp. Ser., 1986(17):41-44 (1986), and/or Wotring, L.L., et al., "Mechanism of activation of tricyribine phosphate (TCN-P) as a prodrug form of TCN", Cancer Treat Rep., 70(4):491-7 (April 1986).

Sales farmacéuticamente aceptables

50 En los casos en que los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales ácidas o básicas no tóxicas estables, la administración del compuesto como una sal farmacéuticamente aceptable puede ser apropiado. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de bases y ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Las sales adecuadas incluyen aquellas derivadas de metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre numerosos otros ácidos bien conocidos en la técnica farmacéutica. En particular, ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de 55 ácidos orgánicos formadas con ácidos, que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato, y α -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, que incluyen, sales de sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

60 Se pueden obtener las sales farmacéuticamente aceptables utilizando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo al hacer reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado que proporciona un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden elaborar sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (por ejemplo calcio) de ácidos carboxílicos.

Definiciones

Como se utiliza aquí, los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado, es decir, trastornos proliferativos. Ejemplos de dichos trastornos proliferativos incluyen cánceres tales como carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia, así como otros cánceres divulgados aquí. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de células epidermoides, cáncer de pulmón de células microcíticas, cáncer de pulmón de células no microcíticas, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, por ejemplo, carcinoma hepático, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer de riñón, y cáncer de tiroides.

Otros ejemplos de cáncer son carcinoma de células basales, cáncer del tracto biliar; cáncer de hueso; cáncer del cerebro y SNC; coriocarcinoma; cáncer de tejido conjuntivo; cáncer de esófago; cáncer de ojo; cáncer de cabeza y cuello; cáncer gástrico; neoplasia intraepitelial; laringe cáncer; linfoma que incluye linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin; melanoma; mieloma; neuroblastoma; cáncer de cavidad oral (por ejemplo, labio, lengua, boca y faringe); cáncer de páncreas; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma; cáncer de recto; cáncer del sistema respiratorio; sarcoma; cáncer de piel; cáncer de estómago; cáncer testicular; cáncer uterino; cáncer del sistema urinario, así como otros carcinomas y sarcomas.

Como se utiliza aquí, el término “tumor” se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásica, ya sea células y tejidos malignos o benignos, y todos los precancerosos y cancerosos. Por ejemplo, un cáncer particular se puede caracterizar por un tumor de masa sólida. La masa de tumor sólido, si está presente, puede ser una masa de tumor primario. Una masa del tumor primario se refiere a un crecimiento de células de cáncer en un tejido resultante de la transformación de una célula normal de ese tejido. En la mayoría de los casos, la masa del tumor primario se identifica por la presencia de un quiste, que se puede encontrar a través de métodos visuales o palpación, o por la irregularidad en la forma, la textura o el peso del tejido. Sin embargo, algunos tumores primarios no son palpables y se pueden detectar solo a través de técnicas de formación de imágenes médicas tales como rayos X (por ejemplo, mamografía), o mediante aspiraciones con aguja. El uso de estas últimas técnicas es más común en la detección temprana. El análisis molecular y fenotípico de las células de cáncer dentro de un tejido por lo general confirmar si el cáncer es endógeno al tejido o si la lesión se debe a metástasis de otro sitio.

El término alquilo, como se utiliza aquí, a menos que se especifique lo contrario, incluye un hidrocarburo saturado, recto, ramificado, o cíclico, primario, secundario, o terciario de por ejemplo de C₁ a C₂₄, e incluye específicamente metilo, trifluorometilo, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, y 2,3-dimetilbutilo. El alquilo está opcionalmente sustituido, por ejemplo, con uno o más sustituyentes tales como halo (F, Cl, Br o I), (por ejemplo, CF₃, 2-Br-etilo, CH₂F, CH₂Cl₂, CH₂CF₃ o CF₂CF₃), hidroxilo (por ejemplo, CH₂OH), amino (por ejemplo, CH₂NH₂, CH₂NHCH₃ o CH₂N (CH₃)₂), alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, azido (por ejemplo, CH₂N₃), ciano (por ejemplo, CH₂CN), ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, o fosfonato, ya sea sin protección, o protegidos según sea necesario, como es conocido por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, como se enseña en Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Segunda Edición, 1991.

El término alquilo inferior, como se utiliza aquí, y a menos que se especifique lo contrario, se refiere a un alquilo C₁ a C₄ saturado lineal, ramificado, o si es apropiado, un grupo cíclico alquilo (por ejemplo, ciclopropilo), que incluyen tanto formas sustituidas como no sustituidas.

El término alquilamino o arilamino incluye un grupo amino que tiene uno o dos sustituyentes alquilo o arilo, respectivamente.

El término aminoácido incluye aminoácidos de origen natural y aminoácidos α, β, γ o δ sintéticos, e incluye pero no se limita a, aminoácidos encontrados en las proteínas, es decir, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina. En una realización preferida, el aminoácido está en la configuración L. Alternativamente, el aminoácido puede ser un derivado de alanilo, valinilo, leucinilo, isoleuccinilo, prolinilo, fenilalaninilo, triptofanilo, methioninilo, glicinilo, serinilo, treoninilo, cisteinilo, tirosinilo, asparaginilo, glutaminilo, aspartoilo, glutarilo, lisinilo, argininilo, histidinilo, β-alanilo, β-valinilo, β-leucinilo, β-isoleuccinilo, β-prolinilo, β-fenilalaninilo, β-triptofanilo, β-methioninilo, β-glicinilo, β-serinilo, β-threoninilo, β-cisteinilo, β-tirosinilo, β-asparaginilo, β-glutaminilo, β-aspartoilo, β-glutarilo, β-lisinilo, β-argininilo o β-histidinilo. Cuando se utiliza el término aminoácido, se considera que es una divulgación específica e independiente de cada uno de los ésteres de un aminoácido natural o sintético, que incluyen pero no limitado a α, β, γ o δ glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina en las configuraciones D y L.

El término “protegido” como se utiliza aquí y a menos que se defina de otra forma incluye un grupo que se agrega a un átomo de oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo para prevenir su reacción adicional o para otros propósitos. Una amplia variedad de grupos protectores de oxígeno y nitrógeno son conocidos por aquellos expertos en la técnica de

la síntesis orgánica (véase Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Ed., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, 1999).

El término arilo, como se utiliza aquí, y a menos que se especifique lo contrario, incluye fenilo, bifenilo, o naftilo, y preferiblemente fenilo. El grupo arilo se sustituye opcionalmente con uno o más grupos funcionales tales como halo, hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, o fosfonato, ya sea no protegido, o protegido como es necesario, como es conocido por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, como se enseña en Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley y Sons, 3ª Ed., 1999.

El término alcarilo o alquilarilo incluye un grupo alquilo con un sustituyente arilo. El término aralquilo o arilalquilo incluye un grupo arilo con un sustituyente alquilo.

El término halo, como se utiliza aquí, incluye cloro, bromo, yodo, y fluoro. El término acilo incluye un éster de ácido carboxílico en el que el grupo funcional no carbonilo del grupo éster se selecciona de alquilo inferior lineal, ramificado o cíclico, alcoxilalquilo que incluye metoximetilo, aralquilo que incluye bencilo, ariloxilalquilo tal como fenoximetilo, arilo que incluye fenilo opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C₁ a C₄ o alquilo C₁ a C₄, ésteres de sulfonato alcoxi tales como alquilo o aralquilo sulfonilo que incluye metanosulfonilo, el mono, di o éster de trifosfato, trilito o monometoxitritilo, bencilo sustituido, trialkilsililo (por ejemplo, dimetil-t-butilsililo) o difenilmetilsililo. Los grupos arilo en los ésteres comprenden de manera óptima un grupo fenilo. El término "acilo inferior" se refiere a un grupo acilo en el que el grupo funcional no carbonilo es alquilo inferior.

Como se utiliza aquí, el término "sustancialmente libre de" o "sustancialmente en ausencia de" con respecto a la pureza enantiomérica, se refiere a una composición que incluye por lo menos 85% o 90% en peso, preferiblemente 95% a 98% en peso, y aún más preferiblemente 99% a 100% en peso, del enantiómero designado. En una realización preferida, en los métodos y compuestos de esta invención, los compuestos están sustancialmente libres de otros enantiómeros.

De manera similar, el término "aislado" se refiere a una composición de compuesto que incluye por lo menos 85% o 90% en peso, preferiblemente 95% a 98% en peso, y aún más preferiblemente 99% a 100% en peso, del compuesto, comprendiendo el resto otras especies químicas o enantiómeros.

El término "independientemente" se utiliza aquí para indicar que la variable, que se aplica de forma independiente, varía independientemente de aplicación a aplicación. Por lo tanto, en un compuesto tal como R "XYR", en el que R es 'independientemente carbono o nitrógeno', ambos R puede ser carbono, ambos R pueden ser nitrógeno o un R puede ser carbono y el otro R nitrógeno.

El término "sal o profármaco farmacéuticamente aceptable" se utiliza en toda la especificación para describir cualquier forma farmacéuticamente aceptable (tal como un éster, éster de fosfato, sal de un éster o un grupo relacionado) de un compuesto, que, luego de administración a un paciente, proporciona el compuesto. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de bases y ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Las sales adecuadas incluyen aquellas derivadas de metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre otros numerosos ácidos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Los profármacos farmacéuticamente aceptables se refieren a un compuesto que se metaboliza, por ejemplo hidroliza u oxida, en el anfitrión para formar el compuesto de la presente invención. Ejemplos típicos de profármacos incluyen compuestos que tienen grupos protectores biológicamente lábiles en un grupo funcional del compuesto activo. Los profármacos incluyen compuestos que pueden ser oxidados, reducidos, aminados, desaminados, hidroxilados, deshidroxilados, hidrolizados, deshidrolizados, alquilados, desalquilados, acilados, desacilados, fosforilados, desfosforilados para producir el compuesto activo.

El término "ésteres farmacéuticamente aceptables" como se utiliza aquí, a menos que se especifique lo contrario, incluye aquellos ésteres de uno o más compuestos, que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para uso en contacto con los tejidos de los anfitriones sin indebida toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, son proporcionados con una relación beneficio/riesgo razonable, y son eficaces para su uso pretendido.

El término "sujeto" como se utiliza aquí, se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano. Los mamíferos pueden incluir mamíferos no humanos, que incluyen, pero no se limitan a, cerdos, ovejas, cabras, vacas (bovino), ciervos, mulas, caballos, monos y otros primates no humanos, perros, gatos, ratas, ratones, conejos o cualesquier otros conocidos o divulgados aquí.

II. Efectividad in vivo/regímenes de dosificación

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan regímenes de dosificación que limitan los efectos secundarios tóxicos de TCNP. En una realización, dichos regímenes de dosificación minimizan los siguientes efectos secundarios tóxicos, que incluyen, pero no se limitan a, hepatotoxicidad, trombocitopenia, hiperglicemia, vómito,

hipocalcemia, anemia, hipoalbumemia, mielosupresión, hipertrigliceridemia, hiperamilasemia, diarrea, estomatitis y/ o fiebre.

5 En otra realización, la administración de TCN-P proporciona por lo menos una respuesta parcial o completa in vivo en por lo menos 15-20% de los sujetos. En realizaciones particulares, una respuesta a parcial puede diezer por lo menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 o 85% de regresión del tumor. En otras realizaciones, esta respuesta puede ser evidente en por lo menos 15, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90% de los sujetos tratados con la terapia. En realizaciones adicionales, dichas tasas de respuesta se pueden obtener mediante cualquier régimen terapéutico divulgado aquí.

10 En otras realizaciones, se proporcionan tratamientos para un sujeto que se ha diagnosticado con cáncer al administrar al sujeto una cantidad efectiva de TCN-P de acuerdo con un esquema de dosificación que incluye administrar el fármaco una vez por semana durante tres semanas seguidas por un periodo de una semana en el que no se administra el fármaco (es decir a través de un ciclo de 28 días). En otras realizaciones, dichos ciclos de 28 días se pueden repetir por lo menos 2, 3, 4, o 5 veces o hasta que es evidente la regresión del tumor.

15 En realizaciones adicionales, se proporciona un ciclo de 42 días en el que los compuestos divulgados aquí se pueden administrar una vez una semana durante cuatro semanas seguidas en un periodo de dos semanas en el que no se administra el fármaco. En otras realizaciones, dichos ciclos de 42 días se pueden repetir por lo menos 2, 3, 4, o 5 veces o hasta que es evidente la regresión del tumor. En una realización particular, menos de 12, menos de 11 o menos de 10 mg/m² de TCN-P se puede administrar de acuerdo con un ciclo de 42 días. En otras realizaciones particulares, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11 mg/m² de TCN-P se puede administrar de acuerdo con un ciclo de 42 días.

20 En otra realización, se proporcionan tratamientos contra el cáncer en un sujeto al administrar al sujeto un régimen de dosificación de 10 mg/m² o menos de TCN-P una vez por semana. En realizaciones particulares, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 o 10 mg/m² de TCN-P se puede administrar una vez por semana

25 En realizaciones de la presente invención, el compuesto divulgado aquí se puede administrar como una dosis de único bolo durante un corto periodo de tiempo, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 30 o 60 minutos. En realizaciones adicionales, se proporcionan esquemas de dosificación en los que los compuestos se administran a través de infusión continua durante por lo menos 24, 48, 72, 96, o 120 horas. En ciertas realizaciones, la administración del fármaco a través de inyecciones continuas o de bolo se puede repetir a una cierta frecuencia por lo menos: una vez una semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez un mes, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada diez semanas y/o una vez cada doce semanas. El tipo y frecuencia de administraciones se puede combinar de cualquier manera divulgada aquí para crear un ciclo de dosificación. Los fármacos se pueden administrar repetidamente a través de un cierto ciclo de dosificación, por ejemplo como una inyección de bolo una vez cada dos semanas durante tres meses. Los ciclos de dosificación se pueden administrar durante por lo menos: uno, dos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, dieciocho o veinticuatro meses. Alternativamente, por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 o 20 ciclos de dosificación se pueden administrar a un paciente. El fármaco se puede administrar de acuerdo con cualquier combinación divulgada aquí, por ejemplo, el fármaco se puede administrar una vez una semana cada tres semanas durante 3 ciclos.

30 En realizaciones adicionales, los compuestos se pueden administrar por lo menos una vez un día durante por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días. Dicha administración puede seguir por periodos correspondiente en los que no se administra el fármaco.

35 La TCN-P se puede administrar a pacientes en una cantidad que sea efectiva en provocar regresión de tumor. La administración de TCN-P puede proporcionar por lo menos una respuesta parcial, tal como por lo menos 15, 20 o 30%, o respuesta completa in vivo en por lo menos 15-20% de los sujetos. En ciertas realizaciones, por lo menos 2, 5, 10, 15, 20, 30 o 50 mg/m² de un compuesto divulgado aquí se puede administrar a un sujeto. En ciertas realizaciones, por lo menos aproximadamente 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 165, 175, 200, 250, 300, o 350 mg/m² de TCN-P se puede administrar a un sujeto.

40 La administración del compuesto se puede conducir de acuerdo con cualquiera de los regímenes terapéuticos divulgados aquí. En realizaciones particulares, el régimen de dosificación incluye administrar menos de 20 mg/m² de TCN-P. En una realización, se puede administrar menos de 20 mg/m² de TCN-P una vez una semana. En realizaciones adicionales, se puede administrar 2 mg/m², 5 mg/m², 10 mg/m², y/o 15 mg/m² de TCN-P a un sujeto. En otra realización, menos de 10 mg/m² se puede administrar a un sujeto a través de infusión continua durante por lo menos cinco días. La presente invención proporciona cualquier combinación de tipo de dosificación, frecuencia, número de ciclos y cantidad de dosificación divulgada aquí.

III. Cribado de Poblaciones de Pacientes

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos para identificar cánceres o tumores que sean susceptibles a los efectos tóxicos de fosfato de triciribina (TCN).

En una realización, los tratamientos contra cáncer o tumor se proporcionan en un mamífero al (i) obtener una muestra biológica del tumor; (ii) determinar si el cáncer o tumor sobreexpresa quinasa Akt o quinasa Akt hiperactivada y fosforilada, y (iii) tratar el cáncer o tumor con triciribina o un compuesto relacionado como se describe aquí. En una realización, la muestra biológica puede ser una biopsia. En otras realizaciones, la muestra biológica puede ser fluida, células y/o aspirados obtenidos del tumor o cáncer.

Se puede obtener la muestra biológica de acuerdo con cualquier técnica conocida para un experto en la técnica. En una realización, se puede conducir una biopsia para obtener la muestra biológica. Una biopsia es un procedimiento realizado para eliminar el tejido o células del cuerpo para examen. Algunas biopsias se pueden realizar en el consultorio de un médico, mientras que otras necesitan ser hechas en un entorno hospitalario. Adicionalmente, algunas biopsias requieren el uso de un anestésico para adormecer el área, mientras que otros no requieren ninguna sedación. En ciertas realizaciones, se puede realizar una biopsia endoscópica. Este tipo de biopsia se lleva a cabo a través de un endoscopio de fibra óptica (un tubo largo y delgado que tiene un telescopio de método cercano en el extremo para la visión) a través de un orificio natural del cuerpo (es decir, recto) o de una pequeña incisión (es decir, artroscopia). El endoscopio se utiliza para ver el órgano en cuestión para áreas anormales o sospechosas, con el fin de obtener una pequeña cantidad de tejido para estudio. Los procedimientos endoscópicos se nombran para el área de órgano o cuerpo que se va a visualizar y/o tratar. El médico puede insertar el endoscopio en el tracto gastrointestinal (endoscopia del tracto alimenticio), vejiga (cistoscopia), cavidad abdominal (laparoscopia), cavidad de articulación (artroscopia), porción media del pecho (mediastinoscopia), o tráquea y sistema bronquial (laringoscopia y broncoscopia).

En otra realización, se puede realizar una biopsia de médula ósea. Este tipo de biopsia se puede realizar ya sea desde el esternón (hueso del pecho) o el hueso de la cadera cresta ilíaca (el área de hueso a cada lado de la pelvis en el área de la espalda inferior). La piel se limpia y se aplica anestesia local para adormecer la zona. Una aguja larga y rígida se inserta en la médula ósea, y las células se aspiró para el estudio; este paso es ocasionalmente incómodo. Una biopsia de núcleo (retirar un pequeño hueso 'chip' de la médula ósea) puede seguir a la aspiración.

En una realización adicional, se puede realizar una biopsia excisional o incisional en el mamífero. Este tipo de biopsia se utiliza a menudo cuando se necesita una porción más ancha o más profunda de la piel. Utilizando un escalpelo (cuchillo quirúrgico), se retira un espesor de la piel para examen adicional, y la herida se sutura (se cosió y se cerró con hilo quirúrgico). Cuando se retira todo el tumor, que se conoce como una técnica de biopsia por escisión. Si se retira sólo una porción del tumor, que se conoce como una técnica de biopsia incisional. La biopsia excisional es a menudo el método normalmente preferido, por ejemplo, cuando se sospecha de melanoma (un tipo de cáncer de piel).

En aún realizaciones adicionales, se puede utilizar una biopsia de aspiración con aguja fina (FNA). Este tipo de biopsia implica el uso de una aguja fina para eliminar trozos muy pequeños de un tumor. La anestesia local se utiliza a veces para adormecer el área, pero la prueba no produce molestias y no deja cicatriz. El FNA, por ejemplo, se utiliza para el diagnóstico de un lunar sospechoso, pero se puede utilizar, por ejemplo, para biopsia de ganglios linfáticos grandes cerca de un melanoma para ver si el melanoma ha hecho metástasis (diseminación). Un escáner de tomografía computarizada (escáner CT o CAT) se puede utilizar para guiar una aguja en un tumor en un órgano interno tal como el pulmón o hígado.

En otras realizaciones, se pueden realizar biopsias de afeitado del punzón y/o piel. Las biopsias del punzón involucran tomar una muestra más profunda de la piel con un instrumento de biopsia que elimina un cilindro corto, o "núcleo de manzana", de tejido. Después de que se administra un anestésico local, el instrumento se gira en la superficie de la piel hasta que corta a través de todas las capas, incluyendo la dermis, epidermis, y las partes más superficiales de la subcutis (grasa). Una biopsia de afeitado implica la eliminación de las capas superiores de la piel mediante raspado. Las biopsias de afeitado también se realizan con un anestésico local. Las biopsias de piel implican la eliminación de una muestra de piel para su examen bajo el microscopio para determinar si, por ejemplo, está presente el melanoma. La biopsia se realiza bajo anestesia local.

En una realización particular, se proporcionan métodos para determinar si el tumor sobreexpresa una quinasa Akt. quinasa Akt sobreexpresión puede referirse al estado de fosforilación de la quinasa. Hiperfosforilación de Akt puede ser detectado de acuerdo con los métodos descritos aquí. En una realización, una biopsia de tumor se puede comparar con un tejido de control. El tejido de control puede ser un tejido normal del mamífero del que se obtuvo la biopsia o un tejido normal de un mamífero sano. La sobreexpresión o hiperfosforilación de la quinasa Akt se puede determinar si la biopsia del tumor contiene mayores cantidades de quinasa Akt y/o fosforilación de la quinasa Akt que el tejido de control, tales como, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 1.5, 2, 2.25, 2.5, 2.75, 3, 3.25, 3.5, 3.75, 4, 4.25, 4.5, 4.75, 5, 5.5, 6, 7, 8, 9, o 10 veces mayores cantidades de quinasa Akt que figuran en el tejido de control.

En una realización, la presente invención proporciona un método para detectar la expresión de quinasa Akt aberrante en un sujeto o en una muestra biológica del sujeto al poner en contacto células, extractos celulares, suero u otra muestra de los sujetos o dicha muestra biológica con una molécula inmunoreactiva específica a una quinasa Akt o porción antigénica de la misma y detectar el nivel de formación de complejo quinasa-Akt molécula inmunoreactiva, en el que una presencia elevada del complejo en relación con una célula normal es indicadora de una célula aberrante que expresa o sobreexpresa Akt. En un ejemplo, las células o extractos celulares se pueden cribar inmunológicamente para la presencia de niveles elevados de quinasa Akt.

En una realización alternativa, se detecta la expresión aberrante de Akt en una célula en el nivel genético mediante el cribado para el nivel de expresión de un gen que codifica una Akt, quinasa en la que un nivel elevado de un producto de expresión de transcripción (es decir, mRNA) en comparación con una célula normal es indicadora de una célula aberrante. En ciertas realizaciones, el PCR en tiempo real, así como otros procedimientos de PCR se pueden utilizar para determinar la actividad transcripcional. En una realización, el mRNA se puede obtener de células de un sujeto o de una muestra biológica de un sujeto y de cADN generado opcionalmente. El mRNA o cADN se pueden poner en contacto con una sonda genética capaz de hibridar con y/o amplificar la totalidad o parte de una secuencia de nucleótidos que codifica quinasa Akt o su secuencia de nucleótidos complementaria y entonces el nivel de mRNA o cADN se puede detectar en el que se puede evaluar la presencia de niveles elevados de mRNA o cADN en comparación con los controles normales.

Sin embargo, otra realización de la presente invención contempla el uso de un anticuerpo, monoclonal o policlonal, para la quinasa Akt en un kit de diagnóstico cuantitativo o semi-cuantitativo para determinar los niveles relativos de quinasa Akt en células de un paciente se sospecha tiene cáncer, que puede incluir todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo. En una realización, se proporciona un kit que utiliza reactivos y materiales necesarios para realizar un ensayo ELISA. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, regulador de lavado, regulador de dilución de anticuerpos, regulador de bloqueo, solución de tinción celular, solución de desarrollo, solución de detección, anticuerpos específicos de proteína anti-fosfo, anticuerpos específicos de proteína anti-Pan, anticuerpos secundarios, y agua destilada. El kit también puede incluir instrucciones de uso y, opcionalmente, puede ser automatizado o semi-automatizado o en una forma que sea compatible con la máquina o software automatizado. En una realización, un anticuerpo Akt fósforo-Ser-473 que detecta la forma activada de AKT (Akt fosforilada en serina 474) se puede utilizar como el anticuerpo en un kit de diagnóstico. Véase, por ejemplo, Yuan et al. (2000) "Frequent Activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of fosfinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer", *Oncogene* 19:2324-2330.

Quinasas Akt

La Akt, también llamada PKB³, representa una subfamilia de la serina/treonina quinasa. Se han identificado tres miembros, AKT1, AKT2, y Akt3, en esta subfamilia. La Akt se activa mediante estímulos extracelulares de una manera dependiente de PI3K (Datta, S. R., et al. *Genes Dev.* 13: 2905-2927, 1999). La activación completa de Akt requiere la fosforilación de Thr³⁰⁸ en el bucle de activación y Ser⁴⁷³ en el dominio de activación C-terminal. La Akt se regula negativamente por supresor de tumores PTEN. Se han identificado mutaciones en PTEN en diversos tumores, que conducen a la activación de Akt (Datta, S. R., et al. *Genes Dev.* 13: 2905-2927, 1999). Adicionalmente, se ha detectado amplificación, sobreexpresión y/o activación de Akt en una serie de tumores malignos humanos (Datta, S. R., et al. *Genes Dev.* 13: 2905-2927, 1999, Cheng, J. Q., and Nicosia, S. V. AKT signal transduction pathway in oncogenesis. In Schwab D, editor. *Encyclopedic Reference of Cancer*. Berlin Heidelberg and New York: Springer; 2001. pp 35-7). La expresión ectópica de Akt, especialmente Akt constitutivamente activa, induce la supervivencia celular y transformación maligna mientras que la inhibición de la actividad de Akt estimula la apoptosis en una amplia gama de células de mamíferos (Datta, S. R., et al. *Genes Dev.* 13: 2905-2927, 1999, Cheng, J. Q., and Nicosia, S. V. AKT signal transduction pathway in oncogenesis. In Schwab D, editor. *Encyclopedic Reference of Cancer*. Berlin Heidelberg and New York: Springer; 2001. pp35-7, Sun, M., et al. *Am. J. Path.*, 159: 431-437, 2001, Cheng, J. Q., et al. *Oncogene*, 14: 2793-2801, 1997). Adicionalmente, se ha demostrado que la activación de Akt se asocia con la invasividad tumoral y la quimiorresistencia (West, K. A., et al. *Drug Resist. Updat.*, 5: 234-245, 2002).

La activación de la ruta de Akt cumple una función fundamental en la transformación maligna y la quimiorresistencia al inducir la supervivencia, crecimiento, migración, y angiogénesis celular. La presente invención proporciona métodos para determinar los niveles de Akt sobreexpresión de quinasa y/o quinasa Akt hiperactivada y fosforilada.

La quinasa Akt puede ser cualquier familia de quinasas Akt conocida, o quinasa relacionada con la misma, que incluyen, Akt1, Akt2, Akt3. El mRNA y secuencias de aminoácidos de Akt1, Akt2, y Akt 3 humana se ilustran en las figuras 6a-c, 7a-d, y 8a-c, respectivamente.

Ensayos de diagnóstico

Ensayos inmunológicos

En una realización, se proporciona un método para detectar la expresión aberrante de una quinasa Akt en una célula en un mamífero o en una muestra biológica del mamífero, al poner contacto células, extractos celulares o suero u

otra muestra del mamífero o muestra biológica con una molécula inmunoreactiva específica para una quinasa Akt o porción antigénica de la misma y detectar el nivel de las formaciones de complejos de quinasa Akt-molécula inmunoreactivos y determinar si está presente una presencia elevada del complejo en relación con una célula normal.

5 La molécula inmunoreactiva puede ser una molécula que tiene especificidad y afinidad de unión por una quinasa Akt o sus partes antigénicas o sus homólogos o derivados de la misma. En una realización, la molécula inmunoreactiva puede ser una molécula de inmunoglobulina. En otras realizaciones, las moléculas inmunoreactivas pueden ser fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, y/o moléculas desinmunizadas que incluyen anticuerpos humanizados y moléculas de unión al antígeno asociadas a células T (TABMs). En una realización particular, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. En otra realización particular, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal. La molécula inmunoreactiva puede exhibir especificidad a una quinasa Akt o más particularmente un determinante antigénico o epítipo en una quinasa Akt. Un determinante antigénico o epítipo en una quinasa Akt incluye la parte de la molécula a la que se dirige una respuesta inmunitaria. El determinante antigénico o epítipo puede ser un epítipo de células B o en su caso un epítipo de células T. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo Akt fósforo-Ser 473.

20 Una realización de la presente invención proporciona un método para diagnosticar la presencia de cáncer o crecimiento similar a cáncer en un mamífero, en el que la actividad de Akt aberrante está presente, al poner en contacto células o extractos de células de mamífero o una muestra biológica del sujeto con una cantidad efectiva de unión a quinasa Akt de un anticuerpo que tiene especificidad para la quinasa Akt o un determinante o epítipo antigénico de la misma y luego determinar cuantitativamente o cualitativamente el nivel de un complejo de quinasa Akt-anticuerpo en el que se determina la presencia de niveles elevados de dicho complejo en comparación con una normal de las células.

25 Los anticuerpos se pueden preparar mediante cualquiera de un número de medios conocidos para un experto en la técnica. Por ejemplo, para la detección de quinasa Akt humana, los anticuerpos pueden ser generalmente pero no necesariamente derivados de animales no humanos tales como primates, ganado (por ejemplo, ovejas, vacas, cerdos, cabras, caballos), animales de ensayo de laboratorio (por ejemplo ratones, ratas, conejillos de indias, conejos) y/o animales de compañía (por ejemplo perros, gatos). Los anticuerpos también se pueden producir de forma recombinante en células anfitrionas procariontas o eucariotas. Generalmente, los ensayos basados en anticuerpos pueden llevarse a cabo in vitro en biopsias de células o tejidos. Sin embargo, si un anticuerpo se desinmuniza adecuadamente o, en el caso de uso humano, humaniza, entonces, el anticuerpo se puede marcar con, por ejemplo, una etiqueta nuclear, administrada a un paciente y el sitio de la acumulación de marca nuclear se determina por técnicas radiológicas. El anticuerpo quinasa Akt puede ser un agente de cáncer de focalización. De acuerdo con lo anterior, otra realización de la presente invención proporciona formas desinmunizadas de los anticuerpos para su uso en formación de imágenes de cáncer en pacientes humanos y no humanos.

40 En general, para la generación de anticuerpos para una quinasa Akt, se requiere que se extraiga la enzima de una muestra biológica ya sea de animal, incluyendo tejido humano o a partir de cultivo de células si se produce por medios recombinantes. La quinasa Akt puede separarse de la muestra biológica mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, la separación puede tomar ventaja de uno cualquiera o más de las propiedades de carga superficial de la quinasa Akt, tamaño, densidad, actividad biológica y su afinidad por otra entidad (por ejemplo, otro compuesto de proteína o químico al que se une o de otro modo asocia). Por lo tanto, por ejemplo, la separación de la quinasa Akt del fluido biológico puede conseguirse mediante uno cualquiera o más de ultracentrifugación, cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico), electroforesis (por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida, método isoelectrico), separación por tamaño (por ejemplo, filtración en gel, ultrafiltración) y separación mediada por afinidad (por ejemplo, separación por inmutafinidad, que incluye, pero no se limita a, separación de perlas magnéticas tal como separación Dynabead (marca registrada), inmunocromatografía, inmuno-precipitación). La separación de quinasa Akt del fluido biológico puede preservar los epítopos conformacionales presentes en la quinasa y, por lo tanto, adecuadamente evita técnicas que provocan la desnaturalización de la enzima. En una realización adicional, la quinasa se puede separar del fluido biológico utilizando una cualquiera o más de separación por afinidad, filtración en gel y/o ultra-filtración.

55 La inmunización y posterior producción de anticuerpos monoclonales se puede llevar a cabo utilizando protocolos estándar conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, descritos por Kohler y Milstein (Kohler and Milstein, Nature 256: 495-499, 1975; Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol. 6(7): 511-519, 1976), Coligan et al. ("Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 1991-1997) or Toyama et al. (Monoclonal Antibody, Experiment Manual", published by Kodansha Scientific, 1987). Esencialmente, se inmuniza un animal con un fluido biológico que contiene quinasa Akt o fracción del mismo o una forma recombinante de la quinasa Akt mediante métodos estándar para producir células productoras de anticuerpos, particularmente células somáticas productoras de anticuerpos (por ejemplo, linfocitos B). Estas células pueden entonces ser retirados del animal inmunizado para la inmortalización. En cierta realización, un fragmento de una quinasa Akt se puede utilizar para generar anticuerpos. El fragmento puede estar asociado con un portador. El portador puede ser cualquier sustancia de peso molecular normalmente alta en el

que una sustancia no o poco inmunogénica (por ejemplo, un hapteno) se une natural o artificialmente para mejorar su inmunogenicidad.

5 La inmortalización de células productoras de anticuerpos se puede llevar a cabo utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la inmortalización se puede conseguir mediante el método de transformación utilizando virus Epstein-Barr (EBV) (Kozbor et al., *Methods in Enzymology* 121: 140, 1986). En otra realización, las células productoras de anticuerpo se inmortalizan mediante el método de fusión celular (descrito en Coligan et al., 1991-1997, supra), que se emplea ampliamente para la producción de anticuerpos monoclonales. En este método, las células productoras de anticuerpos somáticas con el potencial para producir anticuerpos, particularmente células B, se fusionan con una estirpe celular de mieloma. Estas células somáticas se pueden derivar de los ganglios linfáticos, bazo y sangre periférica de animales cebados, preferiblemente animales roedores tales como ratones y ratas. En una realización particular, se pueden utilizar células de bazo de ratones. En otras realizaciones, también se pueden utilizar células de rata, conejo, oveja o cabra. Se han desarrollado estirpes celulares de mieloma especializadas a partir de tumores linfocíticos para su uso en procedimientos de fusión productores de hibridoma (Kohler and Milstein, 1976, supra; Shulman et al., *Nature* 276: 269-270, 1978; Volk et al., *J. Virol.* 42(1): 220-227, 1982). También se pueden utilizar muchas estirpes celulares de mieloma para la producción de híbridos de células fusionadas, que incluyen, por ejemplo P3.times.63-Ag8, P3.times.63-AG8.653, P3/NS1-Ag4-1 (NS1), SP2/0-Agl4 y S194/5.XXO.Bu.1. Las estirpes de células P3.times.63-Ag8 y NS-1 se han descrito por Kohler and Milstein (1976, supra). Shulman et al. (1978, supra) desarrollaron la estirpe de mieloma Sp2/0- Ag14. La estirpe 194/5.XXO.Bu.1 se reportó por Trowbridge (*J. Exp. Med.* 148(1): 313-323, 1978). Los métodos para generar híbridos de células de bazo o de ganglios linfáticos productoras de anticuerpos y células de mieloma usualmente implican mezclar células somáticas con células de mieloma en una proporción 10:1 (aunque la proporción puede variar desde aproximadamente 20: 1 a aproximadamente 1: 1), respectivamente, en presencia de un agente o agentes (químico, vírico o eléctrico) que promueve la fusión de las membranas celulares. Los métodos de fusión se han descrito (Kohler and Milstein, 1975, supra; Kohler and Milstein, 1976, supra; Geffer et al., *Somatic Cell Genet.* 3: 231-236, 1977; Volk et al., 1982, supra). Los agentes que promueven la fusión utilizados por aquellos investigadores fueron virus de Sendai y polietilenglicol (PEG). En ciertas realizaciones, los medios para seleccionar los híbridos de células fusionadas de las células no fusionadas restantes, particularmente, se proporcionan las células de mieloma no fusionadas. Generalmente, la selección de híbridos de células fusionadas se puede lograr mediante el cultivo de células en medios que soportan el crecimiento de hibridomas pero impiden el crecimiento de las células de mieloma no fusionadas que normalmente se dividirían indefinidamente. Las células somáticas utilizadas en la fusión no mantienen viabilidad a largo plazo en cultivo in vitro y por lo tanto no suponen un problema. Se requieren varias semanas para cultivar selectivamente los híbridos de células fusionadas. A principios de este período de tiempo, es necesario identificar aquellos híbridos que producen el anticuerpo deseado, de modo que posteriormente se pueden clonar y se propagan. En general, alrededor del 10% de los híbridos obtenidos producen el anticuerpo deseado, aunque un rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 30% no es infrecuente. La detección de los híbridos productores de anticuerpos se puede lograr mediante cualquiera de varios métodos estándar de ensayo, que incluyen inmunoensayo ligado a enzimas y técnicas de radioinmunoensayo como, por ejemplo, descritos en Kennet et al. (*Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, pp 376-384, Plenum Press, New York, 1980) and by FACS analysis (O'Reilly et al., *Biotechniques* 25: 824-830, 1998).

Una vez que se han seleccionado y clonado los híbridos de células fusionadas deseados en estirpes celulares productoras de anticuerpos individuales, cada estirpe celular se puede propagar de cualquiera de dos formas estándar. Una suspensión de las células de hibridoma se puede inyectar en un animal histocompatible. El animal inyectado luego desarrollará tumores que secretan el anticuerpo monoclonal específico producido por el híbrido celular fusionado. Los fluidos corporales del animal, tales como suero o fluido de ascitis, se pueden tomar para proporcionar anticuerpos monoclonales en alta concentración. Alternativamente, las estirpes celulares individuales pueden ser propagadas in vitro en recipientes de cultivo de laboratorio. El medio de cultivo que contiene altas concentraciones de un solo anticuerpo monoclonal específico se puede recoger mediante decantación, filtración o centrifugación, y posteriormente purificada.

Las estirpes celulares pueden ser probadas para su especificidad para detectar la quinasa Akt de interés por cualquier medio de inmunodetección adecuados. Por ejemplo, las estirpes celulares pueden estar en alícuotas en una serie de pozos e incubadas y el sobrenadante de cada pozo se analiza mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la técnica de inmunofluorescencia indirecta, o similares. La estirpe celular(s) que produce un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer la LIM quinasa objetivo pero que no reconoce epítomos no objetivo se identifican y luego directamente se cultivan in vitro o se inyecta en un animal histocompatible para formar tumores y para producir, recolectar y purificar los anticuerpos requeridos.

La presente invención proporciona, por lo tanto, un método para detectar en una muestra una quinasa Akt o fragmento, variante o derivado del mismo que comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo y detectar el nivel de un complejo que contiene el anticuerpo y quinasa Akt o fragmento, variante o derivado de la misma en comparación con los controles normales, en los que se determinaron los niveles elevados de quinasa Akt. Se puede utilizar cualquier técnica adecuada para determinar la formación del complejo. Por ejemplo, un anticuerpo de acuerdo con la invención, que tiene una molécula informadora asociada con la misma, se puede utilizar en inmunoensayos. Dichos inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a

radioinmunoensayos (RIAs), ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) técnicas de inmunocromatografía (TIC), y transferencia de Western que son bien conocidos para aquellos expertos en la técnica. Los inmunoensayos pueden incluir también ensayos competitivos. La presente invención abarca inmunoensayos cualitativos y cuantitativos.

Se describen técnicas de inmunoensayo adecuadas, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,016,043, 4,424,279 y 4,018,653. Estas incluyen ensayos de un solo sitio y ensayos de dos sitios de los tipos no competitivos, así como ensayos de unión competitiva tradicionales. Estos ensayos también incluyen la unión directa de una molécula de unión a antígeno marcada a un antígeno objetivo.

La invención proporciona adicionalmente métodos para cuantificar la expresión de proteína Akt y niveles de activación en las células o muestras de tejidos obtenidas de un animal, tal como un paciente de cáncer humano o de un individuo que se sospecha cáncer. En una realización, la invención proporciona métodos para cuantificar la expresión de proteína Akt o niveles de activación utilizando un sistema de formación de imagen cuantitativamente. El sistema de formación de imagen se puede utilizar para recibir, mejorar, y procesar imágenes de células o muestras de tejidos, que han sido manchados con manchas específicas a la proteína AKT, con fin de determinar la cantidad o el nivel de activación de la proteína AKT expresada en las células o muestras de tejido de dicho animal. En realizaciones de los métodos de la invención, una curva de calibración de expresión de la proteína AKT1 y AKT2 puede ser generado para por lo menos dos estirpes celulares que expresan diferentes cantidades de proteína AKT. La curva de calibración luego se puede utilizar para determinar cuantitativamente la cantidad de proteína AKT que se expresa en una muestra de células o tejido. Las curvas de calibración análogas se pueden hacer para proteínas AKT activadas utilizando reactivos específicos para las características de activación. También se puede utilizar para determinar los cambios en las cantidades y estado de activación de AKT antes y después del tratamiento del cáncer clínico.

En una realización particular de los métodos de la invención, la expresión de proteína AKT en una muestra de célula o tejido se puede cuantificar utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para determinar la cantidad de proteína AKT en una muestra. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en la Publicación de Patente Estadounidense No. 2002/0015974.

En otras realizaciones se pueden utilizar inmunoensayos enzimáticos para detectar la quinasa Akt. En dichos ensayos, una enzima se conjuga con el segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o peryodato. Los sustratos que se van a utilizar con las enzimas específicas se eligen generalmente para la producción de, luego de hidrólisis por la enzima correspondiente, un cambio de color detectable. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, que producen un producto fluorescente en lugar de los sustratos cromogénicos. El anticuerpo marcado con enzima se puede agregar al primer complejo anticuerpo-antígeno, permitir la unión, y luego el exceso de reactivo se lava. Una solución que contiene el sustrato apropiado luego se puede agregar al complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El sustrato puede reaccionar con la enzima ligada al segundo anticuerpo, dando una señal visual cualitativa, que puede cuantificarse adicionalmente, usualmente espectrofotométricamente, para dar una indicación de la cantidad de antígeno que estaba presente en la muestra. Alternativamente, los compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína, rodamina y lantánido, europio (UE), se pueden acoplar químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa por iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por emisión de la luz en un color característico visualmente detectable con un microscopio de luz. Se deja que el anticuerpo marcado fluorescente se una al primer complejo anticuerpo-antígeno. Después de lavar el reactivo no unido, el complejo terciario restante luego se expone entonces a la luz de una longitud de onda apropiada. La fluorescencia observada indica la presencia del antígeno de interés. Ensayos inmunofluorométrico (IFMA) están bien establecidos en la técnica y son particularmente útiles para el presente método. Sin embargo, también se pueden emplear otras moléculas informadoras, tales como moléculas de radioisótopos, quimioluminiscentes o bioluminiscentes.

En una realización particular, los anticuerpos para quinasa Akt también se puede utilizar en la detección mediada por ELISA de quinasa Akt, especialmente en el suero u otro fluido circulatorio. Esto se puede lograr al inmovilizar anticuerpos anti-quinasa Akt a un soporte sólido y poner en contacto estos con un extracto biológico tal como suero, sangre, linfa u otro fluido corporal, extracto celular o biopsia celular. Se pueden utilizar anticuerpos anti-quinasa Akt marcados para detectar la quinasa Akt inmovilizada. Este ensayo se puede variar en cualquier número de formas y todas las variaciones están abarcadas por la presente invención y son conocidas por un experto en la técnica. Este método puede permitir la rápida detección y la cuantificación de los niveles de quinasa Akt utilizando, por ejemplo, un ensayo basado en suero.

En una realización, un kit de ensayo Elisa de Akt se puede utilizar en la presente invención. Por ejemplo, una activación celular de kit de señalización ELISA para Akt S473 de SuperArray Bioscience se puede utilizar en la presente invención. En una realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-pan que reconoce Akt S473. El Kit Elisa de ensayo que contiene un anticuerpo anti-Akt y reactivos adicionales, que incluyen, pero no se limitan a, regulador de lavado, regulador de dilución de anticuerpos, regulador de bloqueo, solución de tinción celular, solución de revelado, solución de parada, anticuerpos secundarios, y agua destilada.

Detección de nucleótidos

En otra realización, un método para detectar quinasas Akt se proporciona mediante la detección del nivel de expresión en una célula de un polinucleótido que codifica una quinasa Akt. La expresión del polinucleótido se puede determinar utilizando cualquier técnica adecuada conocida por los expertos en la técnica. En una realización, se puede utilizar un polinucleótido marcado que codifica una quinasa Akt como una sonda en una transferencia Northern de un extracto de ARN obtenido a partir de la célula. En otras realizaciones, se puede utilizar un extracto de ácido nucleico de un animal en concierto con los cebadores de oligonucleótidos correspondiente para secuencias sentido y antisentido de un polinucleótido que codifica la quinasa, o las secuencias flanqueantes de la misma, en una reacción de amplificación de ácido nucleico tal como RT PCR. Una variedad de técnicas de detección en fase sólida automatizada también está disponibles para un experto en la técnica, por ejemplo, como se describe por Fodor et al. (Science 251: 767-777, 1991) y Kazal et al. (Nature Medicine 2: 753-759, 1996).

En otras realizaciones, se proporcionan métodos para detectar transcripciones de ARN que codifican quinasa Akt. El ARN se puede aislar de una muestra celular sospechosa de contener ARN de quinasa Akt, por ejemplo ARN total aislado de tejido de cáncer humano. El ARN se puede aislar por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo utilizando el reactivo TRIZOL (Gibco-BRL/Life Technologies, Gaithersburg, Md.). Los oligonucleótidos de secuencia aleatoria, oligo-dT, o así como oligonucleótidos específicos de secuencia se pueden emplear como un cebador en una reacción de transcriptasa inversa para preparar cADN de primera hebra a partir del ARN aislado. El cADN de primera cadena resultante luego se puede amplificar con los oligonucleótidos específicos de secuencia en las reacciones de PCR para producir un producto amplificado.

Reacción en cadena de polimerasa o "PCR" se refiere a un procedimiento o técnica en la que cantidades de un fragmento preseleccionado de ácido nucleico, ARN y/o ADN, se amplifican como se describe, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 4,683,195. Generalmente, la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá se emplea para diseñar cebadores de oligonucleótidos. Estos cebadores serán idénticos o similares en secuencia a cadenas opuestas de la plantilla que se va a amplificar. Se puede utilizar PCR para amplificar secuencias de ARN específicas y cADN transcrito a partir de ARN celular total. Véase en general Mullis et al. (Quant. Biol. 51: 263, 1987; Erlich, eds., PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989). Por lo tanto, la amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos por PCR se basa en oligonucleótidos o "cebadores" que tienen secuencias de nucleótidos conservadas en las que las secuencias conservadas se deducen de alineamientos de secuencias de genes o proteínas relacionadas, por ejemplo, una comparación de secuencias de los genes de quinasa de mamíferos Akt. Por ejemplo, se prepara un cebador que se predice se va a hibridar con la hebra antisentido y se prepara otro cebador que se predice se va a hibridar con la cadena sentido de una molécula de cADN que codifica una quinasa Akt. Para detectar el producto amplificado, la mezcla de reacción se somete normalmente a electroforesis en gel de agarosa o de otra técnica de separación conveniente y la presencia relativa de la quinasa Akt detectó ADN amplificado específico. Por ejemplo, el ADN amplificado por quinasa Akt se puede detectar utilizando hibridación de Southern con una sonda de oligonucleótido específica o la comparación de su movilidad electroforética con estándares de ADN de peso molecular conocido. El aislamiento, purificación y caracterización del ADN de quinasa Akt amplificada se puede llevar a cabo mediante la escisión o al eluir el fragmento a partir del gel (por ejemplo, véase las referencias Lawn et al., Nucleic Acids Res. 2: 6103, 1981; Goeddel et al., Nucleic acids Res. 8: 4057-1980), la clonación del producto amplificado en un sitio de clonación de un vector adecuado, tal como el vector pCRII (Invitrogen), la secuenciación del inserto clonado y comparando la secuencia de ADN a la secuencia conocida de la quinasa LIM. Luego se pueden determinar las cantidades relativas de mARN y cADN de quinasa LIM.

En una realización, la PCR en tiempo real se puede utilizar para determinar los niveles de transcripción de nucleótidos de Akt. La determinación de la actividad transcripcional incluye también una medida de la actividad potencial traslacional basada en transcripciones de mARN disponibles. La PCR en tiempo real, así como otros procedimientos de PCR utilizan una serie de químicas para la detección de producto de PCR que incluye la unión de ADN fluoróforos, los 5' de la endonucleasa, trazador de estirpes y horquilla adyacentes oligosondas y los amplicones de auto-fluorescente de unión. Se discuten Estas químicas y PCR en tiempo real en general, por ejemplo, en Mackay et al, Nucleic Acids Res 30 (6): 1292-1305, 2002; Walker, J. Biochem. Mol. Toxicología 15 (3): 121-127, 2001; Lewis et al., J. Pathol. 195: 66-71, 2001.

En una realización alternativa, se puede identificar la expresión aberrante de Akt al poner en contacto secuencias de nucleótidos aisladas de una muestra biológica con una sonda de oligonucleótido que tiene una secuencia complementaria a una secuencia de Akt seleccionadas de las secuencias de nucleótido de las figuras 6a-c, 7a-d, o 8a-c, o fragmento del mismo y, luego detectar la secuencia mediante hibridación de la sonda a la secuencia, y comparar los resultados con una muestra normal. La hibridación de la sonda a la muestra biológica se puede detectar mediante el etiquetado de la sonda utilizando cualquier agente detectable. La sonda se puede marcar por ejemplo, con un radioisótopo, o con biotina, colorante fluorescente, reactivo denso en electrones, una enzima, hapteno o proteína para el que los anticuerpos están disponibles. El marcador detectable se puede ensayar mediante cualquier medio deseado, incluyendo medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, radioisotópicos, o químicos. La sonda también se puede detectar utilizando técnicas tales como una técnica de restricción de oligómeros, un ensayo dot blot, un ensayo de transferencia dot blot, un ensayo de

sonda de línea, y un ensayo de 5' nucleasa. Alternativamente, la sonda se puede detectar utilizando cualquiera de las tecnologías de la matriz de ADN generalmente aplicables, incluidas las tecnologías macromatriz, micromatriz y microchip de ADN. La sonda de oligonucleótido normalmente incluye aproximadamente por lo menos 14, 15, 16, 18, 20, 25 o 28 nucleótidos que se hibridan con los nucleótidos seleccionados de las figuras 6a-c, 7a-d, y 8a-c, o un fragmento del mismo. Generalmente, no se prefiere utilizar una sonda que es mayor que aproximadamente 25 o 28 nucleótidos de longitud. La sonda de oligonucleótido está diseñada para identificar una secuencia de nucleótidos Akt.

Ensayos de quinasa

La actividad de las quinasa Akt se puede medir utilizando cualquier ensayo de quinasa adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, y no a modo de limitación, se pueden utilizar los métodos descritos en Hogg et al (Oncogene 1994 9:98-96), Mills et al (J. Biol. Chem. 1992 267:16000-006) and Tomizawa et al 2001 (FEBS Lett. 2001 4 2: 221-7), Schmandt et al, (J. Immunol. 1994, 152:96-105). Adicionalmente se describen ensayos de serina, quinasa treonina y tirosina en Ausubel Ausubel et al. (Short Protocols in Molecular Biology, 1999, unit 17.6).

Generalmente se pueden utilizar ensayos de quinasa Akt, un polipéptido Akt, un sustrato donante marcado, y un sustrato receptor que es ya sea específico o no específico para Akt. En dichos ensayos el Akt transfiere un grupo funcional marcado del sustrato donante al sustrato receptor, y la actividad quinasa se mide por la cantidad de grupo funcional marcado transferido desde el sustrato donador al sustrato receptor. El polipéptido Akt se puede producir utilizando diversos sistemas de expresión, se puede purificar a partir de células, puede estar en forma de una proteína de fusión recombinante dividido o no dividido y/o puede tener secuencias de polipéptido no-Akt, por ejemplo una etiqueta His o beta-galactosidasa en su terminal C o N. La actividad de Akt se puede ensayar en las estirpes de células de cáncer si se utilizan estirpes de células de cáncer como fuente de la Akt que se va a ensayar. Los sustratos donantes adecuados para ensayos de Akt incluyen cualquier molécula que es susceptible a la desfosforilación por Akt., tal como, por ejemplo incluyen análogos de ATP y ATP marcados con gamma, en el que la etiqueta es ³³P, ³²P, ³⁵S o cualquier otro isótopo radiactivo o un marcador fluorescente adecuado. Los sustratos receptores adecuados para ensayos de Akt incluyen cualquier polipéptido u otra molécula que sea susceptible a la fosforilación por Akt. Los sustratos receptores se pueden derivar de fragmentos de objetivos de Akt in vivo. Los fragmentos de sustratos receptores pueden ser de 8 a 50 aminoácidos de longitud, por lo general de 10 a 30 aminoácidos y en particular de aproximadamente 10, 12, 15, 18, 20 y 25 aminoácidos de longitud. Otros sustratos receptores se pueden determinar empíricamente utilizando un conjunto de diferentes polipéptidos u otras moléculas. Los objetivos de sustratos receptores para TTK pueden ser capaces de ser purificados a partir de otros componentes de la reacción una vez que se ha realizado la reacción. Esta purificación se realiza generalmente a través de una interacción molecular, en donde los sustratos receptores se biotinilan y se purifican a través de su interacción con estreptavidina, o un anticuerpo específico que esté disponible puede reconocer específicamente los sustratos receptores. La reacción se puede realizar en una variedad de condiciones, tales como en un soporte sólido, en un gel, en solución o en células vivas. La elección de los métodos de detección depende del tipo de marca utilizada en la molécula donante y puede incluir, por ejemplo, la medición de la radiación o fluorescencia incorporada por autorradiografía, centelleo, escaneo o fluorografía.

IV. Tratamiento

Los compuestos y composiciones farmacéuticas proporcionadas aquí se pueden utilizar en el tratamiento de una afección que incluye tumores, cáncer y otros trastornos asociados con la proliferación celular anormal. En una realización, los compuestos de la presente invención se pueden utilizar para tratar un carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, y/o mieloma. En otras realizaciones de la presente invención, los compuestos divulgados aquí se pueden utilizar para tratar tumores sólidos.

Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento de cáncer, tal como, cáncer de los siguientes órganos o tejidos: mama, próstata, pulmón, bronquio, colon, urinario vejiga, linfoma no Hodgkin, melanoma, riñón, renal, páncreas, faringe, tiroides, estómago, cerebro, mieloma múltiple, esófago, hígado, los conductos biliares intrahepáticos, cuello del útero, de la laringe, leucemia mielóide aguda, leucemia linfática crónica, tejidos blandos, tales como el corazón, el linfoma de Hodgkin, testículo, intestino delgado, leucemia mielóide crónica, leucemia linfática aguda, ano, canal anal, anorrectal, tiroides, la vulva, la vesícula biliar, pleura, ojo, cavidad de la nariz nasal, oído medio, nasofaringe, uréter, peritoneo, omento, mesenterio, y gastrointestinal, de alto grado, glioblastoma, colon, rectal, glioma de páncreas, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular; cánceres de cabeza y cuello, carcinomas; carcinoma de células renales; adenocarcinoma; sarcomas; hemangiendoteloma; linfomas; leucemias, micosis fungoide.

Las composiciones de esta invención se pueden utilizar para tratar estos cánceres y otros cánceres en cualquier etapa desde el descubrimiento del cáncer a etapas avanzadas. Adicionalmente, las composiciones de esta invención se pueden utilizar en el tratamiento del cáncer primario y metástasis de los mismos.

En otras realizaciones de la presente invención, los compuestos descritos aquí se pueden utilizar para el tratamiento de cáncer, que incluye, los cánceres enumerados en la Tabla 2 a continuación.

<input type="checkbox"/> Tabla 2: Tipos de Cáncer	
<input type="checkbox"/> leucemia linfoblástica aguda, Adulto leucemia linfoblástica aguda, Infantil	<input type="checkbox"/> Leucemia de células pilosas Cáncer de cabeza y cuello Cáncer hepatocelular (hígado), Adulto (primario)
Leucemia mieloide aguda, Adulto leucemia mieloide aguda, infantil, Carcinoma corticosuprarrenal carcinoma corticosuprarrenal, Infancia cánceres relacionado con SIDA linfoma relacionado con SIDA cáncer anal astrocitoma, cerebeloso infantil astrocitoma, cerebral infantil <input type="checkbox"/> Carcinoma de célula basal cáncer de ducto filial, extrahepático, cáncer de vejiga cáncer de vejiga, infantil cáncer óseo, osteosarcoma/fibroso maligno histiocitoma glioma del tronco encefálico, infantil tumor cerebral, adultos, tumor encefálico glioma del tronco encefálico, infantil tumor cerebral crónico, cerebeloso astrocitoma infantil Tumor del cerebro, cerebral astrocitoma/glioma maligno, infantil tumor cerebralependimoma, infantil tumor cerebral, meduloblastoma, infantil	Cáncer hepatocelular (hígado), Infantil (Primario) Linfoma de Hodgkin adultos Linfoma de Hodgkin, Infantil linfoma de Hodgkin durante el embarazo Cáncer hipofaríngeo hipotalámico y rutas visuales glioma, Infantil <input type="checkbox"/> melanoma intraocular <input type="checkbox"/> Carcinoma de célula isla (páncreas endocrino) <input type="checkbox"/> sarcoma de Kaposi Cáncer de riñón(células renales) cáncer del riñón Infantil h cáncer de la laringe cáncer de laringe, infantil leucemia aguda Linfoblástica, Adulto Leucemia Linfoblástica Aguda, infantil Leucemia aguda mieloide, adultos leucemia aguda mieloide, infantil, leucemia linfocítica Leucemia crónica, mielógena leucemia, de célula B cáncer de labios y cavidad oral cáncer de hígado, adulto (primario) cáncer de hígado, Infantil (primario) cáncer de pulmón, de célula no microcítica, Cáncer de pulmón, de células pequeñas linfoma, relacionado con el SIDA Linfoma de Burkitt, Linfoma cutáneo de células T, véase
tumor cerebral, supratentoriales neuroectodérmicos primitivos tumores infantiles	micosis fungoide y síndrome de Sézary linfoma, enfermedad de Hodgkin, adultos, linfoma, enfermedad de Hodgkin, infancia
Tumor de cerebro, rutas ópticas y glioma hipotalámico, infantil tumor de cerebro, Infantil cáncer de mama Cáncer de Mama, Infantil Cáncer de Mama Hombre adenomas/carcinoides bronquiales, infantil linfoma de Burkitt <input type="checkbox"/> tumor carcinoide, Infantil <input type="checkbox"/> tumor carcinoide, gastrointestinal Carcinoma de origen primario desconocido linfoma del sistema nervioso central, primario astrocitoma cerebeloso, Infantil astrocitoma cerebral /maligno, glioma, Infantil cáncer de cuello uterino cánceres infantiles leucemia linfocítica crónica leucemia mielógena crónica trastornos mieloproliferativos crónicos cáncer de colon cáncer colorrectal, infantil linfoma cutáneo de células T, ver micosis fungoide y Síndrome de Sézary	linfoma de Hodgkin durante el embarazo Linfoma, no Hodgkin, adulto linfoma, no Hodgkin, infantil linfoma, no-Hodgkin durante el embarazo, linfoma, Sistema nervioso central <input type="checkbox"/> macroglobulinemia,de Waldenström histiocitoma fibroso maligno hueso/osteosarcoma meduloblastoma, Infantil melanoma melanoma, intraocular (ojo) Carcinoma de células de Merkel mesotelioma, enfermedad maligna en adultos mesotelioma Infantil cáncer de cuello epidermoide metastásico con primario oculto Síndrome de neoplasia endocrina múltiple, infantil mieloma múltiple/Neoplasia de células plasmáticas Fungoides micosis síndromes mielodisplásicos enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas leucemia mielógena, crónica leucemia mieloide aguda en adultos leucemia mieloide, aguda infantil
<input type="checkbox"/> cáncer endometrial ependimoma, Infantil cáncer de esófago	mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos, crónicos <input type="checkbox"/> cáncer de cavidad nasal y senos paranasales

<input type="checkbox"/> Tabla 2: Tipos de Cáncer	
cáncer de esófago, infantil Tumores de la familia de Ewing Tumor de células germinales, extracraneal infantil tumores de células germinales extragonadales cáncer de rutas biliares extrahepáticas cáncer de ojo, melanoma intraocular cáncer ocular, Retinoblastoma <input type="checkbox"/> cáncer de vesícula biliar cáncer gástrico (de estómago) cáncer gástrico (de estómago), infantil Tumor carcinoide gastrointestinal tumor de células germinales, extracraneal, infantil tumor de células germinales, extragonadales Tumor de células germinales, de ovario Tumor trofoblástico de gestación	cáncer de nasofaringe cáncer de nasofaringe, infantil Neuroblastoma Linfoma no Hodgkin, adulto linfoma no hodgkin , infantil linfoma de no Hodgkin durante embarazo, cáncer de pulmón no microcítico <input type="checkbox"/> cáncer oral, Infantil cáncer de la cavidad oral, labios y orofaríngeo Osteosarcoma/fibroso maligno histiocitoma de hueso cáncer de ovario, infantil cáncer epitelial ovárico tumor de células germinales de ovario Tumor de bajo potencial maligno de ovario <input type="checkbox"/> cáncer pancreático
glioma, adulto glioma, del tronco encefálico infantil glioma cerebral infantil astrocitoma glioma de rutas ópticas infantil y de hipotálamo <input type="checkbox"/> cáncer de piel (melanoma) carcinoma de piel, célula de Merkel cáncer de pulmón de célula microcítica	cáncer de páncreas, infantil cáncer de páncreas, células islotas cáncer de seno paranasal y cavidad nasal cáncer paratiroideo cáncer de pene feocromocitoma pineoblastoma y supratentoriales tumores neuroectodérmicos primitivos, Infantiles tumor de pituitaria
cáncer del intestino delgado sarcoma de tejido blando, adulto sarcoma de tejido blando, Infantil Carcinoma de células epidermoides, ver cáncer de piel (no melanoma) cáncer de cuello epidermoide con tumor primario oculto, metastásico Cáncer de estómago (gástrico) Cáncer de estómago (gástrico), Infantil tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, infantiles <input type="checkbox"/> Linfoma de célula T, cutáneo, ver micosis fungoide y Síndrome de Sézary cáncer testicular timoma, Infantil timoma y carcinoma tímico cáncer de tiroides cáncer de tiroides, Infantil cáncer de células de transición de pelvis renal y uréter tumor trofoblástico, gestacional <input type="checkbox"/> Carcinoma de sitio primario desconocido, de adulto Cáncer de sitio primario desconocido, infantil Cánceres poco comunes infantiles cáncer de células de transición de pelvis renal y uréter	Neoplasia/múltiple mieloma de células plasmáticas Blastoma pleuropulmonar Cáncer de embarazo y mama Embarazo y Linfoma de Hodgkin embarazo y linfoma no Hodgkin linfoma del sistema nervioso central primario Cáncer de Próstata <input type="checkbox"/> cáncer rectal Cáncer de célula renal (riñón) Cáncer de célula renal (riñón) , Infantil cáncer de transición de células de pelvis renal y uréter Retinoblastoma rhabdomyosarcoma , Infantil <input type="checkbox"/> cáncer de glándula salival cáncer de glándula salival, Infantil sarcoma, de tumores de familia de Ewing sarcoma de Kaposi, tejido blando, adulto sarcoma, tejido blando, Infantil sarcoma, uterino Síndrome de Sezary cáncer de piel (no melanoma) cáncer de piel, Infantil
Cáncer de uretra Cáncer uterino ,de endometrio sarcoma uterino <input type="checkbox"/> cáncer de la vagina glioma de las rutas ópticas y del hipotálamo, infantil cáncer de vulva <input type="checkbox"/> Macroglobulinemia de Waldenström Tumor de Wilms	

Tumores o cánceres resistentes a fármacos

La invención proporciona compuestos que se pueden utilizar para tratar el cáncer resistente a fármacos, que incluyen las realizaciones de cánceres y fármacos divulgados aquí. En una realización, se puede TCN-P coadministrar con un segundo fármaco.

La resistencia a múltiples fármacos (MDR) se produce en cánceres humanos y puede ser un obstáculo importante para el éxito de la quimioterapia. La resistencia a múltiples fármacos es un fenómeno por el cual las células tumorales in vitro que han sido expuestas a un agente citotóxico desarrollan resistencia cruzada a un rango de compuestos estructural y funcionalmente no relacionados. Adicionalmente, MDR puede ocurrir intrínsecamente en algunos tipos de cáncer y sin exposición previa a los agentes de quimioterapia. Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona tratamientos a un paciente con un cáncer resistente a fármacos, por ejemplo cáncer resistente a múltiples fármacos, mediante la administración de TCN-P.

En ciertas realizaciones, TCN-P se puede utilizar para tratar cánceres que son resistentes a taxol, rapamicina, tamoxifeno, cisplatino, y/o gefitinib (Iressa).

En una realización, TCN-P se puede utilizar para el tratamiento de cánceres resistentes a fármacos del colon, hueso, riñón, adrenal, páncreas, hígado y/o cualquier otro tipo de cáncer conocido en la técnica o descritos aquí.

Terapia de combinación

En un aspecto de la presente invención, los compuestos y composiciones divulgados aquí se pueden combinar con por lo menos un agente quimioterapéutico adicional. Los agentes adicionales se pueden administrar en combinación o alternancia con los compuestos divulgados aquí. Los fármacos pueden formar parte de la misma composición, o proporcionarse como una composición separada para administración al mismo tiempo o un tiempo diferente.

En una realización, los compuestos divulgados aquí se pueden combinar con agentes antiangiogénicos para aumentar su efectividad, o combinarse con otros agentes antiangiogénicos y administrarse junto con otros agentes citotóxicos. En otra realización, los compuestos y composiciones, cuando se utiliza en el tratamiento de tumores sólidos, se pueden administrar con los agentes seleccionados de, pero no limitado a IL-12, retinoides, interferones, angiostatina, endostatina, talidomida, trombospondina-1, trombospondina-2, captoprilo, agentes antineoplásicos tales como interferón alfa, COMP (ciclofosfamida, vincristina, metotrexato y prednisona), etopósido, mBACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y dexametasona), PRO-MACE/MOPP (prednisona, metotrexato (rescate de w/leucovin), doxorubicina, ciclofosfamida, taxol, etopósido/mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbazona), vincristina, vinblastina, angioinhibinas, TNP-470, polisulfato de pentosano, factor plaquetario 4, angiostatina, LM-609, SU-101, CM-101, Techgalan, talidomida, SP-PG y la radiación. En realizaciones adicionales, los compuestos y composiciones divulgadas aquí se pueden administrar en combinación o alternancia con, por ejemplo, fármacos con efectos antimetabólicos, tales como los que se dirigen a elementos citoesqueléticos, incluyendo moduladores de microtúbulos tales como fármacos de taxano (tales como taxol, paclitaxel, taxotere, docetaxel), podofilotoxinas o alcaloides vinca (vincristina, vinblastina); fármacos antimetabolitos (tales como 5-fluorouracilo, citarabina, gemcitabina, análogos de purina tales como pentostatina, metotrexato); agentes de alquilación o mostazas nitrogenadas (tales como nitrosoureas, ciclofosfamida o ifosfamida); fármacos que se dirigen a ADN tal como fármacos de antraciclina adriamicina, doxorubicina, farmorubicina o epirubicina; fármacos que se dirigen a las topoisomerasas tales como el etopósido; hormonas y agonistas o antagonistas de hormonas tales como estrógenos, antiestrógenos (tamoxifeno y compuestos relacionados) y andrógenos, flutamida, leuprorelina, goserelina, ciprotrona o octreotide; fármacos que se dirigen a la transducción de señales en células tumorales incluyendo derivados de anticuerpos tales como herceptina; fármacos alquilantes tales como fármacos de platino (cis-platino, carboplatino, oxaliplatino, paraplatino) o nitrosoureas; fármacos que afectan potencialmente la metástasis de tumores tales como inhibidores de metaloproteinasas de la matriz; terapia génica y agentes antisentido; anticuerpos terapéuticos; otros compuestos bioactivos de origen marino, principalmente las didemnas tales como la aplidina; análogos de esteroides, en particular dexametasona; fármacos antiinflamatorios, incluyendo agentes no esteroideos (tales como el acetaminofeno o el ibuprofeno) o esteroides y sus derivados, en particular dexametasona; fármacos anti-eméticos, que incluyen inhibidores 5HT-3 (tales como gramisetron o ondasetrón), y esteroides y sus derivados, en particular dexametasona. En todavía otras realizaciones, los compuestos y composiciones se pueden utilizar en combinación o alternancia con los agentes quimioterapéuticos se divulgan a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3: agentes quimioterapéuticos	
-13-cis-retinoico -2-amino-6- mercaptopurina -2-CdA -2-clordesoxiadenosina -5-fluorouracilo	-Neosar -Neulasta -Neumega -Neupogen -Nilandron -Nilutamida
-5-FU -6 -TG -6 -Tioguanina -6-mercaptopurina -6-MP - Accitano - actinomicina-D -Adriamicina - Aduvico	-Nitrógeno mostaza -Novaldex -Novantrona - octreótido - acetatooctreótido - Oncospar - Oncovin - Ontak - Onxal
- Acrilina - Ala-Cort - Aldesleukina - Alerntuzumab - Alitretinoina - Alkaban-AQ - Alkeran - Ácido transretinoico -Alpha interferón -Altretamina - Ametopterina - Amifostina -Aminoglutetimida -Anagrelida - Anandrón -Anastrozol -Arabinosilcitosina -ara-C -Aranesp -Aredia -Arimidex -Aromasin - trióxido de arsénico -Asparaginase -ATRA -Avastina -BCG -BCNU - Bevacizumab -Bexaroteno -Bicalutamida -BiCNU -Blenoxane -Bleomicina -Bortezomib -Busulfan -Busulfex -C225 - Leucovorina Calcio	-Oprevelkin -Orapred -Orasona -Oxaliplatino -Paclitaxel -Pamidronato -Panretina - Paraplatino -Pediapred - interferón PEG -Pegaspargasa -Pegfilgrastim -PEG-INTRON -PEG-L-asparaginasa -mostaza de fenilalanina -Platinol -Platinol-AQ -Prednisolona -Prednisona -Prezona -Procarbazina -PROCRIT -Proleukina -Prolifeprospan 20 con implante de carmustina -Purinetoil -Raloxifeno -Reumatrex -Rituxan -Rituximab -Roveron-A (interferón alfa-2a) -Rubex - clorhidrato de Rubidomicina -Sandostatina -Sandostatina LAR - sargramostima -Solu-Cortef -Solu-Medrol -STI-571 -Estreptoizocina
-Campath - Camptosar - camptotecina-11 -Capecitabina -Carac -Carboplatino -Carmustina -Carmustina oblea	-Tamoxifen -Targretin -Taxol -Taxotere -Temodar -Temozolomida -Teniposida -TESPA

<ul style="list-style-type: none"> -Casodex -CCNU -CDDP -CeeNU -Cerubidina -cetuximab -Clorambucilo -Cisplatino - Factor de Citrovorum -Cladribina -Cortisona -Cosmegen - CPT-11 -Ciclofosfamida -Citadren -Citarabina -Citarabina liposomal -Citosar-T - Citoxan -Dacarbazina - dactinomicina -Darbepoetina alfa -Daunomicina -Daunorrubicina - clorhidrato de Daunorrubicina -Daunorrubicina liposomal -DaunoXome -Decadron -Delta -Cortef -Deltasona -Denileuquina difitox -DepoCyt -dexametasona - acetato de dexametasona - fosfato de dexametasona sodio -Dexasona -Dexrazoxana -DHAD 	<ul style="list-style-type: none"> -talidomida -Talomid -TheraCys -Tioguanina -Tioguanina tablete -Tiofosfoamida -Tioplex -Tiotepa -TICE -Toposar -Topotecan -Toremifeno -Trastuzumab -Tretinoina -Trexall -Trisenox -TSPA - VCR - Velban -Velcade -VePesid -Vesanoid -Viadur -Vinblastina - Sulfato de Vinblastina -Vincasar Pfs -Vincristina -Vinorelbina - tartrato de vinorelbina -VLB -VP-16 -Vumon -Xeloda -Zanosar -Zevalina -Zinecard -Zoladex -ácido Zoledrónico -Zometa oblea-Gliadel
<ul style="list-style-type: none"> -DIC -Diodex -Docetaxel -Doxil - doxorrubicina Doxorrubicina liposomal -Droxia 	<ul style="list-style-type: none"> -Glivec -GM-CSF -Goserelina -granulocito - factor estimulante de colonia factor estimulante de colonia de macrófago granulocito -Halotestina
<ul style="list-style-type: none"> -DTIC -DTIC-Dome -Duralone -Efudex - Eligard - Ellence -Eloxatin -Elspar -Emcyt -Epirubicina -Epoetin alfa -Erbitux -Erwinia L-asparaginasa - estramustina 	<ul style="list-style-type: none"> -Herceptina -Hexadrol - Hexalen -Hexametilmelamina -HMM -Hicamtin -Hidrea - Acetato de Hidrocort -Hidrocortisona - fosfato de hidrocortisona sodio succinato de hidrocortisona sodio - fosfato de Hidrocortona -hidroxiurea -Ibritumomab

<ul style="list-style-type: none"> -Etiol -Etopofos -Etoposida -fosfato de Etoposida -Eulexina -Evista -Exemestane -Fareston -Faslodex -Femara -Filgrastim -Floxuridina -Fludara -Fludarabina -Fluoroplex fluorouracilo fluorouracilo (crema) -Fluoximesterona -Flutamida -ácido Fólico -FUDR -Fulvestrant -G-CSF -Gefitinib -Gemcitabina -Gemtuzumab ozogamicina -Gemzar 	<ul style="list-style-type: none"> -Ibritumomab Tiuxetan -Idamicina -Idarubicin -Ifex I-IFN-alfa - ifosfamida -IL -2 - IL-11 - mesilato de Imatinib -Imidazol carboxamida interferón alfa interferón alfa-2b (PEG conjugado) -Interleuquina -2 -Interleuquina-11 intrón A (interferón alfa-2b) -Leucovorin -Leukeran -Leukine -Leuprolida -Leurocristina -Leustatina -Liposomal Ara-C líquido que Pred -Lomustina -L-PAM -L-Sarcolisina - Meticorten
<ul style="list-style-type: none"> -Gleevec -Lupron -Lupron Depot -Matulano -Maxidex -Mecloretamina 	<ul style="list-style-type: none"> -Mitomicina -Mitomicina-C -Mitoxantrona -M-Prednisol -MTC -MTX
<ul style="list-style-type: none"> -Clorhidrato de mecloretamina -Medralona -Medrol -Megace -Megestrol - acetato de Megestrol -Melfalan -Mercaptopurina -Mesna - Mesnex - metotrexato -Methrexato sodio -Metilprednisolona - Milocel -Letrozol 	<ul style="list-style-type: none"> -Mustargen -Mustina -Mutamicina -Mileran -Iressa -Irinotecan -Isotretinoín - Kidrolase -Lanacort -L-asparaginasa -LCR

5 En ciertas realizaciones, se pueden utilizar interferones (IFN) en combinaciones con los compuestos de la presente invención. Los interferones adecuados incluyen: interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa pegilado, que incluyen interferón alfa-2a y interferón alfa 2b, interferón beta, interferón gamma, interferón tau, interferón omega, INFERGEN® (interferon alphacon-1) por InterMune, OMNIFERON (interferón natural) por Viragen, ALBUFERÓN por Human Genome Sciences, REBIF (interferón beta-1a) por Ares-Serono, Omega interferon por biomedicina, Oral interferon Alfa por Amarillo Biosciences, e interferón gamma, interferón tau, y/o gamma interferón-1b por InterMune.

10 En una realización, la TCN-P se puede utilizar en combinación o alternancia con agentes quimioterapéuticos adicionales, tales como aquellos descritos aquí o en la Tabla 3, para el tratamiento de cáncer resistente a fármacos, por ejemplo cáncer resistente a múltiples fármacos. Los cánceres resistentes a fármaco pueden incluir los cánceres de colon, hueso, riñón, adrenal, páncreas, hígado y/o cualquier otro tipo de cáncer conocido en la técnica o descrito aquí. En una realización, el agente quimioterapéutico adicional puede ser un inhibidor de la P-glicoproteína. En 15 ciertas realizaciones no limitantes, el inhibidor de glicoproteína P se puede seleccionar de entre los siguientes

fármacos: verapamilo, ciclosporina (por ejemplo, ciclosporina A), tamoxifeno, antagonistas de calmodulina, dexverapamilo, dexniguldipino, valspodar (PSC 833), biricodar (VX-710), tariquidar (XR9576), zosuquidar (LY335979), laniquidar (R101933), y/o ONT-093.

5 V. Composiciones farmacéuticas

Los portadores farmacéuticos adecuados para administración de los compuestos proporcionados aquí incluyen cualquiera de los portadores conocidos por aquellos expertos en la técnica que son adecuados para el modo particular de administración. Los compuestos se pueden formular como el único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o se pueden combinar con otros ingredientes activos.

Las composiciones que comprenden los compuestos divulgados aquí pueden ser adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (que incluyen bucal y sublingual), vaginal, o parenteral (que incluyen subcutánea, intramuscular, subcutánea, intravenosa, intradérmica, intraocular, intratraqueal, intracisternal, intraperitoneal, y epidural).

Las composiciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante técnicas farmacéuticas convencionales. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación una o más composiciones de la presente invención y uno o más portadores o excipientes farmacéuticos.

Los compuestos se pueden formular en preparaciones farmacéuticas adecuadas tales como soluciones, suspensiones, comprimidos, comprimidos dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida o elixires, para administración oral en soluciones o suspensiones estériles para administración parenteral, así como preparación de parche transdérmico e inhaladores de polvo seco. En una realización, los compuestos descritos anteriormente se formulan en composiciones farmacéuticas utilizando técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Fourth Edition 1985, 126).

En las composiciones, las concentraciones efectivas de uno o más compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se pueden mezclar con uno o más portadores farmacéuticos adecuados. Los compuestos se pueden derivatizar como las sales, ésteres, éteres o ésteres de enol, acetales, cetales, ortoésteres, hemiacetales, hemicetales, ácidos, bases, solvatos, hidratos o profármacos correspondientes antes de formulación. Las concentraciones de los compuestos en las composiciones son eficaces para el suministro de una cantidad, luego de administración, que trata, previene, o mejora uno o más de los síntomas de la enfermedad o trastorno objetivo. En una realización, las composiciones se formulan para administración de dosificación única. Para formular una composición, la fracción en peso del compuesto se disuelve, suspende, dispersa o mezcla de otro modo en un portador seleccionado a una concentración eficaz de tal manera que se alivia, previene la afección tratada, o se mejoran uno o más síntomas.

Las composiciones adecuadas para administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como, comprimidos, comprimidos oblongos, píldoras o grageas cápsulas o cachets, que contiene cada uno una cantidad predeterminada de una o más de las composiciones; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite o como un bolo.

Las composiciones líquidas farmacéuticamente administrables, por ejemplo, se pueden preparar por disolución, dispersión, o de otra manera mezclando un compuesto activo como se ha definido anteriormente y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol, y similares, para formar de este modo una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica a administrar también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes solubilizantes, agentes reguladores del pH, conservantes, agentes aromatizantes, y similares, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato de sodio de trietanolamina, oleato de trietanolamina, y otros de tales agentes. Métodos de preparación de dichas formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para aquellos expertos en esta técnica; por ejemplo, véase Remington Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15ª edición, 1975.

Las composiciones de la presente invención adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen, por ejemplo, pastillas, que tiene los ingredientes en una base aromatizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas, que tienen una o más de las composiciones de la presente invención en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales, que tiene una o más de las composiciones de la presente invención se administra en un portador líquido adecuado.

Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener uno o más de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante; un lubricante; un diluyente; un deslizante; un agente disgregante; un agente colorante; un agente edulcorante; un agente saborizante; un agente humectante; un

recubrimiento emético; y un recubrimiento de película. Ejemplos de aglutinantes incluyen celulosa microcristalina, goma de tragacanto, solución de glucosa, mucílago de acacia, solución de gelatina, melaza, polvinilpirrolidina, povidona, crospovidonas, sacarosa y pasta de almidón. Los lubricantes incluyen talco, almidón, magnesio o estearato de calcio, licopodio y ácido esteárico. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, sacarosa, almidón, caolín, sal, manitol y fosfato de calcio. Los deslizantes incluyen, dióxido de silicio coloidal. Los agentes disgregantes incluyen croscarmelosa de sodio, glicolato de sodio de almidón, ácido alginico, almidón de maíz, almidón de patata, bentonita, metilcelulosa, agar y carboximetilcelulosa. Los agentes colorantes incluyen, por ejemplo, cualquiera de los colorantes FD y C solubles en agua certificados aprobados, mezclas de los mismos; y los colorantes FD y C insolubles en agua suspendidos en hidrato de alúmina. Los agentes edulcorantes incluyen sacarosa, lactosa, manitol y agentes edulcorantes artificiales tales como sacarina, y cualquier número de sabores secados por pulverización. Los agentes aromatizantes incluyen aromas naturales extraídos de plantas tales como frutas y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación agradable, tales como, menta y salicilato de metilo. Los agentes humectantes incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y lauril éter de polioxietileno. Los recubrimientos eméticos incluyen ácidos grasos, grasas, ceras, goma laca, goma laca amoniacal y ftalatos de acetato de celulosa. Los recubrimientos de película incluyen hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polietilenglicol 4000 y ftalato de acetato de celulosa.

Las composiciones adecuadas para la administración tópica a la piel pueden presentarse como ungüentos, cremas, geles, y pastas, que tiene una o más de las composiciones administradas en un portador farmacéutico aceptable.

Las composiciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

Las composiciones adecuadas para administración nasal, cuando el portador es un sólido, incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el rango de 20 a 500 micras que se administran de la manera en que se toma el tabaco, (es decir, mediante inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo que se mantiene cerca de la nariz). Cuando el portador es un líquido (por ejemplo, un pulverizador nasal o como gotas nasales), una o más de las composiciones se pueden mezclar en una solución acuosa o aceitosa, e inhalar o pulverizar en el pasaje nasal.

Las composiciones adecuadas para administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen una o más de las composiciones y portadores apropiados.

Las composiciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, reguladores, bacteriostáticos, y solutos que hacen formulación isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito.

Los medios portadores sólidos o líquidos orgánicos o inorgánicos farmacéuticos adecuados para administración enteral o parenteral se pueden utilizar para fabricar las composiciones. La gelatina, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, grasas vegetales y animales y aceites, goma, glicol de polialquileno, agua, u otros portadores conocidos pueden todos ser adecuados como medios portadores.

Las composiciones se pueden utilizar como el ingrediente activo en combinación con medios portadores uno o más medios portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Como se utiliza aquí, "medio portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los portadores, solventes, diluyentes, u otros vehículos líquidos, de dispersión o suspensión SIDA, agentes de superficie activa, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes, adyuvantes, vehículos, sistemas de administración, disgregantes, absorbentes, conservantes, surfactantes, colorantes, saborizantes, o edulcorantes y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación particular deseada.

Adicionalmente, las composiciones se pueden combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y, opcionalmente, matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas. Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye un relleno sólido, semi-sólido o líquido no tóxico, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones será decidido por el médico asistente dentro del alcance del juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específica para cualquier anfitrión en particular dependerá de una variedad de factores, que incluyen por ejemplo, el trastorno que se va a tratar y la gravedad del trastorno; actividad de la composición específica empleada; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración; ruta de administración; la

velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidencia con la composición específica empleada; y como factores bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está bien dentro de la experiencia de la técnica comenzar con dosis de la composición a niveles más bajos que aquellos requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

Las composiciones se formulan preferiblemente en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. "Forma de dosificación unitaria", como se utiliza aquí, se refiere a una unidad físicamente discreta de la composición adecuada para el anfitrión a ser tratado. Cada dosis debe contener la cantidad de la composición calculada para producir el efecto terapéutico deseado ya sea como tal, o en asociación con el medio portador farmacéutico seleccionado.

Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis o unidad diaria, subdosis diaria, o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente administrado. Por ejemplo, aproximadamente 1-5 mg por día de un compuesto descrito aquí puede reducir el volumen de un tumor sólido en ratones.

La dosificación dependerá de factores del anfitrión tales como el peso, la edad, área superficial, metabolismo, distribución de tejido, la tasa de absorción y la tasa de excreción. En una realización, de aproximadamente 0.5 a 7 gramos por día de un compuesto descrito aquí se pueden administrar a los humanos. Opcionalmente, aproximadamente de 1 a 4 gramos por día del compuesto se pueden administrar a los humanos. En ciertas realizaciones 0.001-5 mg/día se administra a un humano. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz dependerá de muchos factores como se señaló anteriormente. Adicionalmente, está bien dentro de la experiencia de la técnica comenzar con dosis de la composición a niveles relativamente bajos, y aumentar la dosificación hasta que se consigue el efecto deseado.

Las composiciones que comprenden un compuesto descrito aquí se pueden utilizar con una matriz de liberación sostenida, que puede ser hecha de materiales, normalmente polímeros, que son degradables por hidrólisis enzimática o a base de ácido o por disolución. Una vez insertado en el cuerpo, la matriz se acciona por enzimas y fluidos corporales. Una matriz de liberación sostenida, por ejemplo, se elige a partir de materiales biocompatibles tales como liposomas, polilactidas (ácido poliláctico), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), polilactida co-glicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli (orto) ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxylic, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, propileno polivinílico, polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de uno de cualquiera de polilactida, poliglicólido, o polilactida co-glicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

Los compuestos también pueden administrarse en forma de liposomas. Como se conoce en la técnica, los liposomas se derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados mono- o multi-laminares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede utilizar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. El liposoma puede contener, además de una o más composiciones de la presente invención, estabilizantes, conservantes, excipientes, y similares. Ejemplos de lípidos son los fosfolípidos y las fosfatidil colinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticas. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica.

Los compuestos pueden formularse como aerosoles para aplicación, tales como por inhalación. Estas formulaciones para administración al tracto respiratorio pueden estar en la forma de un aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, solo o en combinación con un portador inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de la formulación tendrán, en una realización, diámetros de menos de 50 micras, en una realización menos de 10 micras.

Las composiciones que comprenden los compuestos divulgados aquí se pueden utilizar en combinación con otras composiciones y/o procedimientos para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente. Por ejemplo, un tumor se puede tratar convencionalmente con cirugía, radiación o quimioterapia combinada con una o más composiciones de la presente invención y luego una o más composiciones de la presente invención se pueden administrar posteriormente al paciente para extender el letargo de micrometástasis y para estabilizar, inhibir o reducir el crecimiento de cualquier tumor primario residual.

Realizaciones adicionales

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Las formulaciones se describen en un número de fuentes que son bien conocidos y fácilmente disponibles para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin EW Easton Pennsylvania, Mack Publishing Company, 19th ed.) describe formulaciones que se pueden utilizar en relación con la presente invención. Las formulaciones adecuadas para administración incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas para inyección estériles, que pueden contener antioxidantes, reguladores, bacteriostáticos, y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor

previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o múltiples dosis, por ejemplo ampollas selladas y frascos, y se pueden almacenar en una condición de secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la condición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, antes de uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvo estéril, gránulos, comprimidos, etc. Se debe entender que adicionalmente a los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión.

El compuesto de la presente invención, para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa, se puede combinar ventajosamente con por lo menos un método adicional terapéutico, incluyendo quimioterapia, terapia de radiación, terapia que inhibe selectivamente la señalización de Ras oncogénico, o cualquier otra terapia conocida para aquellos expertos en la técnica del tratamiento y la gestión de cáncer, tales como la administración de un agente anticancerígeno.

Se puede llevar a cabo la administración de TCN-P como una sal. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de ácidos orgánicos formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, alfa-cetoglutarato, y alfa-glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, que incluyen sales de clorhidrato, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden obtener utilizando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo al hacer reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado que proporciona un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden elaborar sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (por ejemplo calcio) de ácidos carboxílicos.

Los compuestos de la presente invención se pueden formular como composiciones farmacéuticas y administrarse a un sujeto, tal como un paciente humano o veterinario, en una variedad de formas adaptadas a la ruta de administración elegida, es decir, por vía oral o parenteral, por rutas intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.

Por lo tanto, los compuestos de la presente invención se pueden administrar sistémicamente, por ejemplo, por vía oral, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable (es decir, portador) tal como un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. Pueden estar encerrados en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, pueden comprimirse en comprimidos, o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, los compuestos pueden combinarse con uno o más excipientes y utilizarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Dichas composiciones y preparaciones deben contener por lo menos 0.1% de agente activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente 2 a aproximadamente 60% del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación efectiva.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: aglutinantes tales como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de calcio; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y se puede agregar un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo o un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria, o aroma de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, ésta puede contener, además de materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Diversos otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, comprimidos, píldoras, o cápsulas pueden recubrirse con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener los compuestos de la invención, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil y propil parabenos como conservantes, un colorante y aromatizante tal como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debería ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Adicionalmente, los compuestos de la invención pueden incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

El agente activo (es decir, TCN-P o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas) se pueden administrar también por vía intravenosa o intraperitoneal por infusión o inyección. Las soluciones del agente activo o sus sales se pueden preparar en agua, opcionalmente mezcladas con un surfactante no tóxico. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina, y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo que están adaptados para la

- preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infusibles estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación final debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un solvente o medio líquido de dispersión que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos, y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos, y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por la formación de liposomas, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o por el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede ser provocada por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, reguladores o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos de la invención en la cantidad requerida en el solvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y las técnicas de liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado presente en las soluciones previamente esterilizadas por filtración.
- Para la administración tópica, los compuestos de la invención se pueden aplicar en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, generalmente será deseable administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un vehículo dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido.
- Los portadores sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los vehículos líquidos útiles incluyen agua, alcoholes o glicoles o agua-alcohol/mezclas de glicol, en el que los compuestos de la invención se pueden disolver o dispersar a niveles eficaces, opcionalmente con la ayuda de surfactantes no tóxicos. Los adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales se pueden agregar para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes se pueden aplicar a partir de almohadillas absorbentes, utilizarse para impregnar vendajes y otros apósitos, o pulverizarse sobre el área afectada utilizando de tipo bomba o de aerosol pulverizadores.
- Los espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales de ácidos grasos y ésteres, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados pueden emplearse también con vehículos líquidos para formar pastas extensibles, geles, ungüentos, jabones, y similares, para aplicación directamente a la piel del usuario. Ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que pueden ser utilizados para entregar los compuestos de la invención a la piel se divulgan en Jacquet et al. (Patente Estadounidense No. 4,608,392), Geria (Patente Estadounidense No. 4,992,478), Smith et al. (Patente Estadounidense No. 4,559,157) y Woltzman (Patente Estadounidense No. 4,820,508).
- Las dosificaciones útiles de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden determinar al comparar su actividad in vitro, y actividad en modelos animales in vivo. Los métodos para la extrapolación de las dosificaciones eficaces en ratones, y otros animales, a humanos son conocidas en la técnica; por ejemplo, véase Patente Estadounidense No. 4,938,949.
- En una realización, la concentración del agente activo en una composición líquida, tal como una loción, puede ser de aproximadamente 0.1-25% en peso, o de aproximadamente 0.5-10% en peso. En una realización, la concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo puede ser de aproximadamente 0.1-5%, Preferiblemente de aproximadamente 0.5-2.5 % en peso. En una realización, las dosificaciones individuales para inyección, infusión o ingestión variarán generalmente entre 5 a 1500 mg, y pueden administrarse, es decir, 1-3 veces al día, para producir niveles de aproximadamente 0.1-50 mg/kg, para adultos. Una dosificación de la presente invención puede estar entre 7.5 a 45 mg por arcilla, administrados por vía oral, con un ajuste apropiado para el peso del cuerpo de un individuo.
- Por consiguiente, la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende TCN-P, como se describe aquí, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral, tópica o parenteral, que comprenden una cantidad de TCN-P o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, constituyen una forma de realización preferida de la invención. La dosis administrada a un sujeto, particularmente un humano, en el contexto de la presente invención debe ser suficiente para efectuar una respuesta terapéutica en el paciente durante un marco de tiempo razonable. Un experto en la técnica reconocerá que la dosificación dependerá de una variedad de factores, que incluyen el estado del animal, el peso corporal del animal, así como la gravedad y etapa del cáncer.
- Una dosis adecuada es la que resultará en una concentración del agente activo en el tejido tumoral que se sabe efectúa la respuesta deseada. La dosis preferida es la cantidad que resulta en la inhibición máxima del crecimiento celular del cáncer, sin efectos secundarios incontrolables. La administración de TCN-P (o una sal farmacéuticamente

aceptable de la misma) puede ser continua o a intervalos distintos, según se puede determinar por una persona medianamente versada en la técnica.

5 Las especies de mamíferos que se benefician de los tratamientos divulgados para la inhibición del crecimiento de células de cáncer, incluyen, primates, tales como monos, chimpancés, orangutanes, humanos, monos; animales domesticados (por ejemplo, mascotas) tales como perros, gatos, conejillos de indias, hámsters, cerdos barrigones vietnamitas, conejos y hurones; animales de granja domesticados, tales como vacas, búfalos, bisonte, caballos, burro, cerdo, ovejas, y cabras; animales exóticos encontrados normalmente en zoológicos, tales como oso, leones, tigres, panteras, elefantes, hipopótamos, rinocerontes, jirafas, antílopes, perezosos, gacelas, cebras, ñus, perros de la pradera, koalas, canguro, zarigüeyas, mapaches, pandas, hiena, focas, leones marinos, elefantes marinos, nutrias, marsopas, delfines y ballenas. Los términos “paciente” y “sujeto” se utilizan aquí de forma intercambiable y se pretende que incluyan dichas especies de mamíferos no humanos y humanos. Del mismo modo, los métodos in vitro de la presente invención se pueden obtener en células de dichas especies de mamíferos.

15 Los pacientes que necesitan tratamiento utilizando los medicamentos de la presente invención se pueden identificar utilizando técnicas estándar conocidas por aquellos de la profesión médica.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración.

20 Ejemplos

Ejemplo 1: Tamizado in vitro

Materiales

25 Estirpes celulares y Grupo de Diversidad de NCI. Todas las estirpes celulares utilizadas en este estudio se adquirieron de ATCC o describieron previamente (Cheng, J. Q., et al. *Oncogene*, 14: 2793-2801, 1997, West, K. A., et al. *Drug Resist. Updat.*, 5: 234-248, 2002, Satyamoorthy, K., et al. *Cancer Res.* 61: 7318-7324, 2001). El Grupo de Diversidad Estructural NCI es una colección de 1992 compuestos seleccionados de entre aproximadamente 140000 compuestos en el depositario de fármacos NCI. Se pueden encontrar datos en profundidad en la selección, estructuras y actividades de estos compuestos de conjunto de diversidad en el sitio web del Programa de Terapéutica del Desarrollo del NCI.

35 Cribado de inhibición del crecimiento celular transformado por Akt. Las células NIH3T3 transformadas AKT2 transforma AKT2 o células control NIH3T3 transfectadas con vector LXSXN (Cheng, J. Q., et al. *Oncogene*, 14: 2793-2801, 1997) se colocaron sobre placa de cultivo de tejido de 96 pozos. Luego de tratamiento con 5 μ M de compuesto del Grupo de Diversidad NCI, el crecimiento celular se detectó con CellTier 96 Un Kit de Proliferación Celular en Solución (Promega). Los compuestos que inhiben el crecimiento de AKT2-transformadas pero no se consideraron células NIH3T3 transfectadas con LXSXN como candidatos del inhibidor de Akt y se sometieron a análisis adicional.

40 Ensayos de supervivencia y apoptosis celular, de proteína quinasa in vivo. Se realizó quinasa in vitro como se describió previamente (véase, por ejemplo, Jiang, K., Coppola, et al. *Mol. Cell. Biol.*, 20:139-148, 2000) La supervivencia celular se ensayó con MTS (Promega). La apoptosis se detectó con anexina V, que se realizó como se describió previamente (Jiang, K., Coppola, et al. *Mol. Cell. Biol.*, 20:139-148, 2000). La Akt y PDK1 recombinante se adquirieron de Upstate Biotechnology Inc.

Resultados

50 La identificación de inhibidores de moléculas pequeñas de ruta de señalización Akt, API-2. Las alteraciones frecuentes de Akt se han detectado en el cáncer humano y la interrupción de la ruta de Akt induce la apoptosis e inhibe el crecimiento tumoral (Jetzt, A., et al. *Cancer Res.*, 63: 697-706, 2003). Por lo tanto, se ha considerado la Akt como un objetivo molecular atractivo para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. Para identificar inhibidores de molécula de Akt, una colección química de 1992 compuestos del NCI (Grupo de Diversidad NCI) se evaluó para agentes capaces de inhibición del crecimiento en células NIH3T3 transformadas con AKT2 pero no transfectadas con vector LXSXN no vacíos como se describe en “Materiales y Métodos”. Los experimentos repetidos mostraron que 32 compuestos inhibieron el crecimiento sólo en las células transformadas de AKT2. El más potente de estos compuestos, API-2 (identificador NCI: NSC 154020), suprimió el crecimiento celular a una concentración de 50 nM. La Figura 1A muestra la estructura química de API-2, que también se conoce como triciribina (Schweinsberg, P. D., et al. *Biochem Pharmacol.*, 30: 2521-2526, 1981). El hecho de que API-2 inhibe células transformadas de AKT2 selectivamente sobre células parentales no transformadas nos llevó a determinar si API-2 es un inhibidor de AKT2 quinasa. Con este fin, la AKT2 se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-AKT2 a partir de células NIH3T3 transformadas con AKT2 después del tratamiento con API-2. Los inmunoprecipitados AKT2 se inmunotransfirieron con anticuerpos anti-fosfo-Akt. Como se muestra en la Figura 1B, la API-2 inhibe significativamente fosforilación AKT2 tanto en treonina 309 como serina-474, que se requieren para activación completa de AKT2 (Datta, S. R., et al. *Genes Dev.* 13: 2905-2927, 1999). Cuando tres isoformas de Akt comparten una alta homología y estructura

similar, se evaluó el efecto de la API-2 sobre sus actividades de quinasa. Se transfectaron células HEK293 con HA-Akt1, -AKT2 y -AKT3, privadas de suero durante la noche y se trataron con API-2 durante 60 min antes de estimulación con EGF (50 ng/ml). Los experimentos triples mostraron que la API-2 suprime la actividad de quinasa inducida por EGF y la fosforilación de Akt1, AKT2 y Akt3 (Figura 1C). Sin embargo, la actividad quinasa de AKT2 recombinante activada constitutivamente (Myr-AKT2) no fue inhibida por API-2 en una reacción de quinasa in vitro (Figura 1D), lo que sugiere que el API2 no inhibe directamente la Akt in vitro y que la API-2 no funciona como competidor de ATP ni como competidor de sustrato que se une al sitio activo de Akt.

La API-2 no inhibe activadores en dirección 5' conocidos de Akt. Se ha documentado bien que la Akt se activa por estímulos extracelulares y moléculas de señalización intracelulares, tales como Ras y Src activada, a través de una manera dependiente de PI3K. Por lo tanto, la inhibición API-2 de Akt podría resultar de moléculas de en dirección 5' de orientación de Akt. Debido a que la PI3K y PDK1 son reguladores en dirección 5' directas de Akt (Datta, S. R., et al. Genes Dev. 13: 2905-2927, 1999), se examinó si la API-2 inhibe PI3K y/o PDK1. Las células HEK293 fueron privadas de suero y luego tratadas con API-2 o un inhibidor de PI3K, wortmanina, durante 30 min antes de estimulación EGF. Se inmunoprecipitó PI3K con anticuerpo anti-p110 α . Los inmunoprecipitados se sometieron a ensayo de quinasa in vitro de PI3K utilizando PI-4-P como un sustrato. Como se muestra en la Figura 2A, la actividad PI3K inducida por EGF fue inhibida por wortmanina pero no por API-2. Para evaluar el efecto de API-2 en PDK1, un ensayo en el que la PDK1 recombinante promueve la fosforilación de treonina-309 de péptidos AKT2 se utilizó en presencia de vesículas de lípidos que contienen fosfatidilinositol. Como se muestra en la Figura 2B, el ensayo se potentemente inhibida por el control PDK1 inhibidor estaurosporina (IC50 = 5 nM). En contraste, la API-2 muestra sólo 21% de inhibición del ensayo en la concentración más alta probada (5.1 μ M). Estos datos demuestran que API-2 no es un potente inhibidor de PDK1. Para evaluar adicionalmente el efecto de la API-2 sobre la activación de PDK1, se examinó el nivel de autofosforilación de PDK1 en la serina-241, un residuo que se fosforila por sí mismo y es crítico para su actividad (Datta, SR, et al. Genes Dev. 13: 2905-2927, 1999), después del tratamiento API-2 de las células HEK293. Los experimentos por triplicado muestran que los niveles de fosforilación de PDK1 no fueron inhibidos por API-2 (Figura 2B). Sin embargo, la wortmanina de inhibidor de PI3K, como se esperaba, inhibe PDK1 estimulada por EGF (Figura 2B).

La API-2 es altamente selectiva para Akt sobre rutas de señalización PKC, PKA, SGK, STAT, JNK, p38 y ERK. La Akt pertenece a la familia quinasa AGC (PKA/PKG/PKC), que también incluyen PKA, PKC, suero y quinasa inducible por glucocorticoides (SGK), quinasa S6 ribosomal p90, p70^{S6K}, mitógenos y proteína quinasa activada por estrés y quinasa relacionada con PKC. Entre la familia de quinasas AGC, las estructuras de proteínas de PKA, PKC y SGK están más cerca de la quinasa Akt que otros miembros. Por lo tanto, luego se examinaron los efectos de API-2 sobre las actividades enzimáticas de estas 3 quinasas. Se transfectaron células HEK293 con PKA etiquetados con HA, PKC o SGK. El ensayo de quinasa in vitro y el análisis de inmunotransferencia mostraron que las actividades quinasa de PKA y PKC α se inhibieron por PKAI y Ro 31-8220, un inhibidor de PKC, respectivamente, mientras que API-2 no exhibió ningún efecto sobre sus actividades (Figura 2C y 2E). Adicionalmente, la actividad de quinasa SGK inducida por suero fue atenuada por wortmanina pero no por API-2 (Figura 2D). Adicionalmente, se determinó si API-2 tiene efecto sobre otras rutas de supervivencia oncogénicas. El análisis por transferencia Western con anti-fosfo-anticuerpos disponibles comercialmente reveló que los niveles de fosforilación de STAT3, JNK, p38 y Erk1/2 no fueron afectados por tratamiento API-2 (Figura 2F). Estos datos indican que API-2 inhibe específicamente la ruta de señalización de Akt.

API-2 Suprime el Crecimiento Celular e Induce apoptosis en Estirpes Celulares de Cáncer Humano que sobreexpresan/que activan Akt La capacidad de API-2 para inhibir selectivamente la ruta de Akt sugiere que debería inhibir la proliferación y/o inducir apoptosis preferentemente en esas células tumorales con expresión/activación aberrante de Akt. Como la activación de Akt en tumores malignos humanos comúnmente resulta de la sobreexpresión de Akt o mutaciones PTEN, se utilizó API-2 para el tratamiento de las células que expresan Akt constitutivamente activa, provocada por la sobreexpresión de AKT2 (NIH3T3 transformado por OVCAR3, OVCAR8, PANC1 y AKT2) o mutaciones del gen PTEN (PC-3, LNCaP, MDA-MB-468), y las células que no (OVCAR5, DU-145, T47D, Colo357 y LXSN-NIH3T3), así como células de melanoma que son activadas por IGF-1 para activar Akt o no responden a la estimulación del crecimiento por IGF-1 (Satyamoorthy, K., et al. Cancer Res. 61: 7318-7324, 2001). El análisis de inmunotransferencia mostró que los niveles de fosforilación de Akt fueron inhibidos por API-2 sólo en las células que expresan Akt elevada o responden a simulación IGF-1 (Figura 3A). De acuerdo con lo anterior, la API-2 inhibió el crecimiento celular en un grado mucho mayor en estirpes celulares que sobreexpresan/que activan Akt en comparación con aquellos con bajos niveles de Akt. Como se muestra en la Figura 3B, el tratamiento API-2 inhibió la proliferación celular mediante aproximada 50-60% en estirpes celulares que sobreexpresan/que activan Akt, LNCaP, PC-3, OVCAR3, OVCA8, PANC1, MDA-MB-468, y WM35, mientras que sólo alrededor de un 10 -20% en las células DU145, OVCAR5, Colo357, T47D y WM852, que exhiben bajos niveles de Akt o no responden a estimulación del crecimiento por IGF-1. Más aún, la API-2 induce la apoptosis por 8 veces (OVCAR3), 6 veces (OVCAR8), 6 veces (PANC1) y 3 veces (AKT2-NIH3T3). No se observó ninguna diferencia significativa de la apoptosis entre el tratamiento de API-2 y vehículo (DMSO) y en células OVCAR5, Colo357 y LXSN-NIH3T3. Por lo tanto, API-2 inhibe el crecimiento celular e induce la apoptosis preferentemente en las células que expresan Akt aberrante.

La API-2 inhibe objetivos en dirección 3' de Akt. Se ha demostrado que Akt ejerce sus efectos celulares a través de la fosforilación de un número de proteínas (Datta, S. R., et al. *Genes Dev.* 13: 2905-2927, 1999). Más de 20 proteínas se han identificado como sustratos de Akt, que incluye los miembros de la familia de proteínas Forkhead (FKHR, AFX y FKHL1), tuberlina/TSC2, p70^{S6K}, GSK-3 β , p21^{WAF1/Cip1}, p27^{kip1}, MDM2, Bad, ASK1 y IKK α etc. Se examinó a continuación si API-2 inhibe objetivos en dirección 3' de Akt. Como anticuerpos anti-fosfo-tuberlina, Bad, AFX, y GSK-3 β están disponibles comercialmente, por lo tanto, se determinó el efecto de la API-2 en su fosforilación inducida por Akt. Después del tratamiento API-2 (1 μ M), se lisaron células OVCAR3 y se sometieron a inmunotransferencia con el anti-fosfo-anticuerpo individual. La Figura 4A muestra que la API-2 inhibió considerablemente los niveles de fosforilación de tuberlina que conducen a la estabilización y regulación en aumento de tuberlina (Dan, H. C., et al. *J. Biol. Chem.*, 277: 35364-35370, 2002). Los niveles de fosforilación de Bad, GSK-3 β , y AFX se atenuaron parcialmente por API-2. Estos datos sugieren que la API-2 induce muerte celular y detención del crecimiento celular al inhibir la fosforilación de sus objetivos en dirección 3'. La inhibición de API-2 de objetivos en dirección 3' de Akt en diferentes grados se podría deber al hecho de que los sitios de fosforilación de estos objetivos también están regulados por otra quinasa(s), por ejemplo, la serina-136 Bad se fosforila por PAK1 además de Akt (Schurmann, A., et al. *Mol. Cell. Biol.*, 20: 453-461, 2000).

Ejemplo 2: Actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto de tumor de ratón sin pelo.

Se recogieron células tumorales, se resuspendieron en PBS, y se inyectaron s.c. en los flancos derecho e izquierdo (2 x 10⁶ células/flanco) de ratones hembra sin piel de 8 semanas de edad como se reportó anteriormente (Sun, J., Blaskovic, et al., *Cancer Res.*, 59: 4919-4926, 1999). Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100-150 mm³, los animales fueron asignados al azar y se dosificaron i.p. con 0.2 ml de vehículo de fármaco al día. Los animales de control recibieron vehículo DMSO (20%), mientras que los animales tratados se inyectaron con API-2 (1 mg/kg/día) en 20% de DMSO.

La API-2 inhibe el crecimiento de tumores en ratones sin pelo que sobreexpresan Akt. Se mostró sobreexpresión/activación y/o amplificación de AKT1 y AKT2 frecuente en el cáncer de ovario y pancreático humano (Cheng, J. Q., and Nicosia, S. V. AKT signal transduction pathway in oncogenesis. In Schwab D, Editor, *Encyclopedic Reference of Cancer*. Berlin Heidelberg and New York: Springer; 2001. pp 35-7). La inhibición de ruta Akt por los inhibidores de PI3K, HSP70, Src y farnesiltransferasa resultaron en la detención del crecimiento celular e inducción de apoptosis (Solit, D. B., et al. *Cancer Res.*, 63: 2139-2144, 2003; Xu, W., et al. *Cancer Res.*, 63: 7777-7784, 2003). Un estudio reciente mostró que el crecimiento de tumores de xenoinjertos con elevada Akt también se inhibió significativamente mediante inyección intratumoral de adenovirus de Akt dominante negativo (Jetzt, A., et al. *Cancer Res.*, 63: 697-706, 2003). Debido a que la API-2 inhibe la señalización Akt e induce la apoptosis y la detención de crecimiento celular sólo en células de cáncer con niveles elevados de Akt (Figura 3), el crecimiento de tumores con niveles elevados de Akt debe ser más sensibles a API-2 que el de los tumores con bajos niveles de Akt en ratones sin pelo. Con este fin, las células Akt que sobreexpresan s.c. (OVCAR3, OVCAR8 y PANC-1) se implantaron s.c. en el flanco derecho, y aquellas estirpes celulares que expresan niveles bajos de Akt (OVCAR5 y Colo357) en el flanco izquierdo de los ratones. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de alrededor de 100-150 mm³, los animales se aleatorizaron y se trataron i.p. con vehículo o API-2 (1 mg/kg/día). Como se ilustra en la Figura 4B, los tumores OVCAR-5 y Colo357 tratados con vehículo crecieron a aproximadamente 800-1000 mm³ 49 días después del implante del tumor. Los tumores OVCAR3, OVCAR8 y PANC1 tratados con vehículo de control crecieron aproximadamente 700-900 mm³ 49 días después de implante del tumor. La API-2 inhibe el crecimiento del tumor OVCAR3, OVCAR8 y PANC1 en un 90%, 88% y 80%, respectivamente. En contraste, la API-2 tuvo poco efecto sobre el crecimiento de células OVCAR5 y Colo357 en ratones sin pelo (Figuras 4B-4D y datos no mostrados). En dosis de 1 mg/kg/día, la API-2 no tuvo efectos sobre el nivel de glucosa en sangre, peso corporal, actividad e ingesta de alimentos de ratones. En muestras tumorales tratadas, la actividad de Akt se inhibió por API-2 sin cambio en el contenido total de Akt (Figura 4E). Tomados en conjunto, estos resultados indican que la API-2 inhibe selectivamente el crecimiento de tumores con niveles elevados de Akt.

Ejemplo 3: TCN inhibe directamente actividad de quinasa Akt tipo silvestre

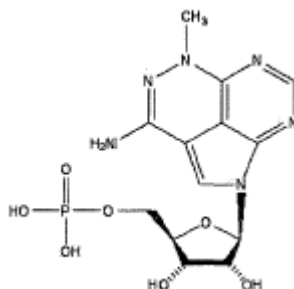
La API-2 (TCN) puede inhibir directamente la actividad de quinasa Akt tipo silvestre inducida por PDK1 in vitro (Figura 1). Este resultado apoya que la API-2 es un inhibidor de Akt directo y que el mecanismo subyacente puede ser API-2 obligatorio al dominio PH y/o treonina 308 de Akt. Un ensayo de quinasa in vitro se realizó con recombinante de PDK1 y Akt en un regulador de quinasa que contiene fosfatidilinositol-3,4,5-P3 (PIP3), API-2 e histona H2B como sustrato. Después de incubación de 30 min, las reacciones se separaron mediante SDS-PAGE y se expusieron en una película.

Ejemplo 4: La TCN es efectiva en células resistentes a cáncer

Los efectos de TCN (API-2) se ensayaron en células resistentes a A270CP, C-13, OVCAR433 y MCF7/TAM resistentes a cisplatino, paclitaxel, y tamoxifeno. La API-2 superó la resistencia a cisplatino, paclitaxel, y tamoxifeno en estas células.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:

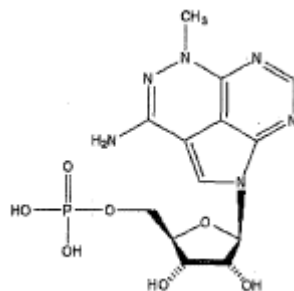


5 para uso en un método para el tratamiento de un tumor o cáncer en un mamífero, en el que el tumor o cáncer sobreexpresa quinasa Akt.

10 2. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en el que la quinasa sobreexpresada es una quinasa Akt hiperactivada y fosforilada.

15 3. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en el que el nivel de expresión de quinasa Akt se determina al ensayar el cáncer para presencia de quinasa Akt fosforilada, o al ensayar el cáncer para presencia de una quinasa Akt fosforilada con un anticuerpo.

4. Un compuesto de la fórmula:

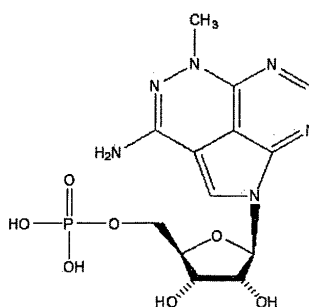


20 para uso en un método para el tratamiento de un tumor o cáncer en un mamífero, en el que el tumor o cáncer exhibe niveles elevados de quinasa Akt, en el que el compuesto se administra de acuerdo con un esquema de dosificación una vez por semana durante tres semanas seguidas por un periodo de una semana en el que no se administra el compuesto.

25 5. El compuesto para el uso de la reivindicación 4, en el que el esquema de dosificación se repite por lo menos dos veces, o por lo menos 4 veces.

6. El compuesto para el uso de la reivindicación 4, en el que por lo menos 10 mg/m² del compuesto se administra, o en el que se administra 10 mg/m² o menos del compuesto.

30 7. Un compuesto de la fórmula:



35 para uso en un método para el tratamiento de un tumor o cáncer, en el que el tumor o cáncer exhibe niveles elevados de quinasa Akt, en el que el compuesto se administra a un sujeto en un régimen de dosificación una vez por semana a una dosis de 10 mg/m² o menos en el que el régimen de dosificación representa un ciclo de dosificación.

8. El compuesto para el uso de la reivindicación 7, en el que el régimen de dosificación se repite durante por lo menos dos semanas, o en el que el régimen de dosificación se repite durante tres semanas, y en el que el periodo de tres semanas es seguido por un periodo de una semana en el que no se administra el fármaco.
- 5 9. El compuesto para el uso de la reivindicación 7, en el que el ciclo de dosificación se repite por lo menos dos veces.
- 10 10. El compuesto para el uso de la reivindicación 7, en el que el ciclo de dosificación se repite hasta que se logra la regresión del cáncer.
- 10 11. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el tumor o cáncer se selecciona del grupo que consiste de mama, pancreático, de ovario, leucemia y colorrectal.
- 15 12. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el cáncer es carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia o mieloma.
- 20 13. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, dicho método comprende administrar adicionalmente el compuesto en combinación o alternación con un agente quimioterapéutico, agente antiangiogénico, o un agente antiangiogénico y un agente citotóxico.
- 25 14. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, dicho método comprende administrar adicionalmente el compuesto en combinación o alternación con paclitaxel, citarabina, ciclofosfamida, doxorubicina, o carbonplatino.
- 30 15. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicho compuesto se administra como sal farmacéuticamente aceptable.
16. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en el que el compuesto se administra por vía intravenosa.

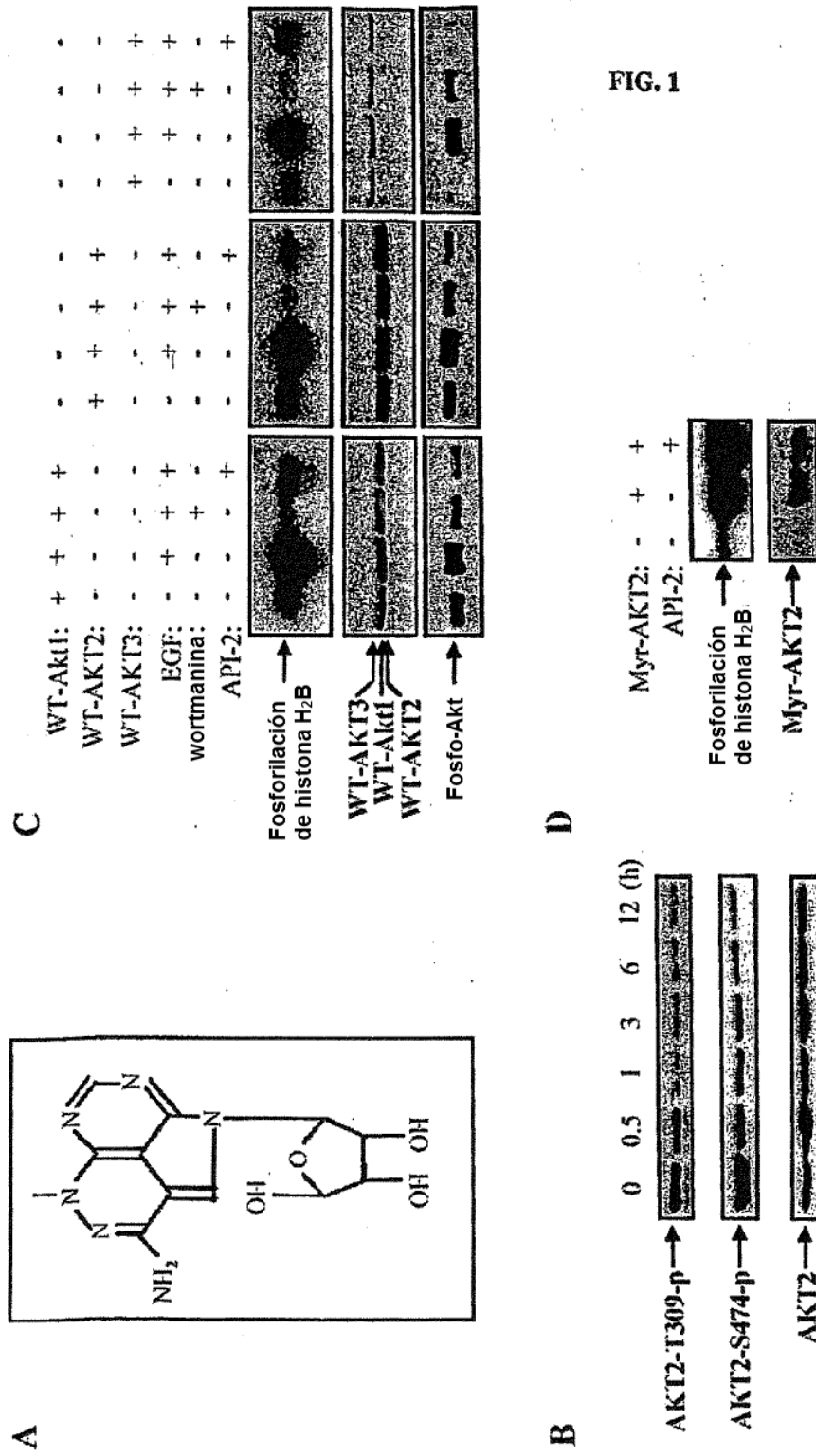
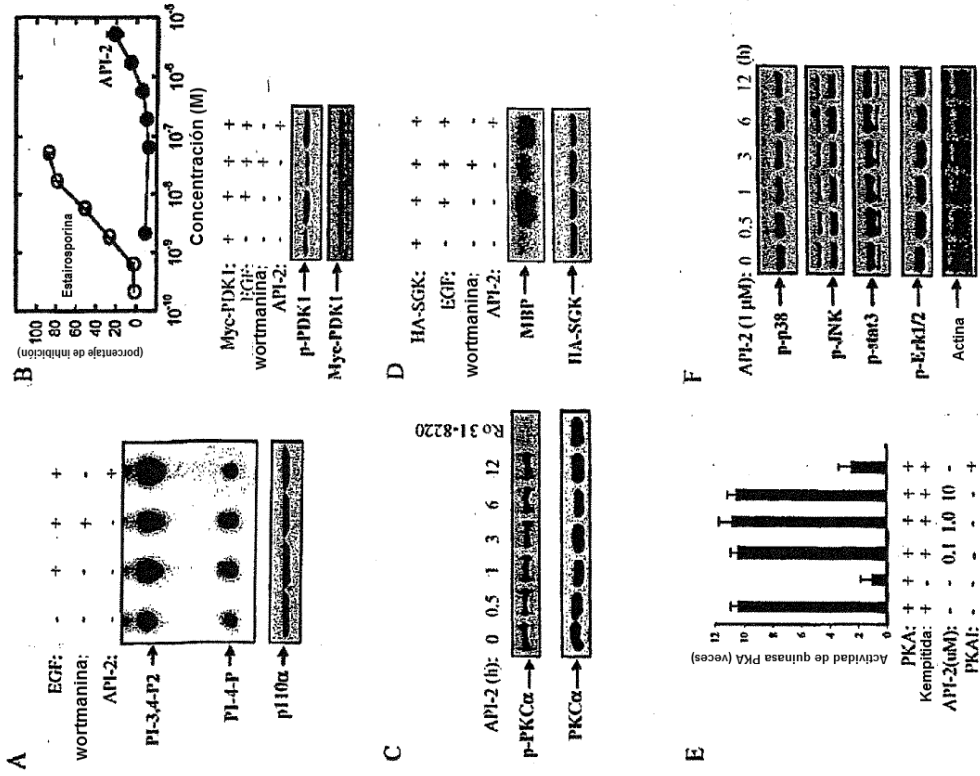


FIG. 1

FIG. 2



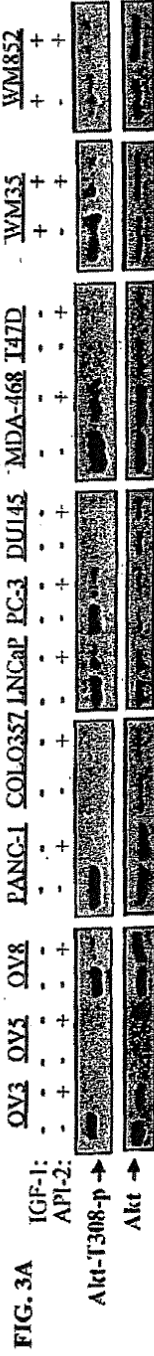


FIG. 3B

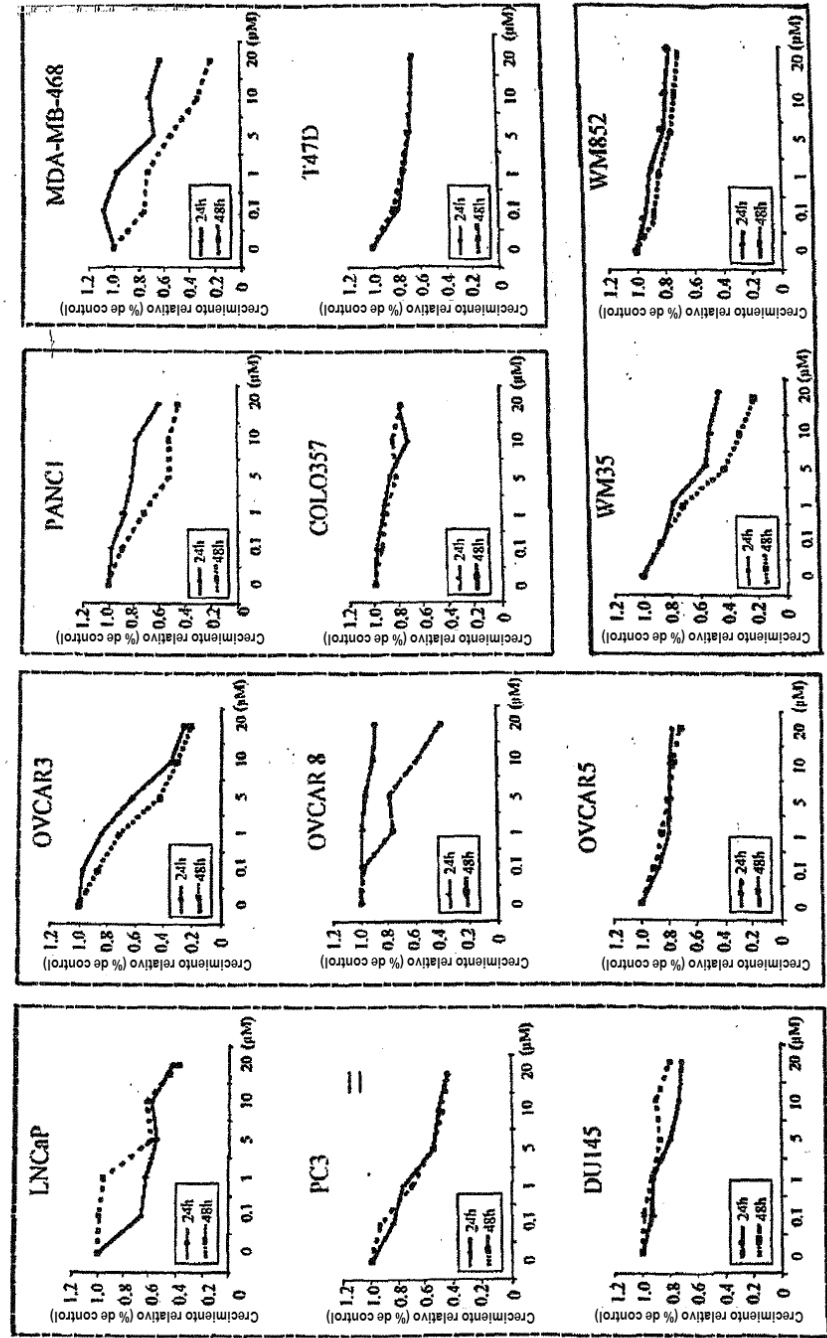
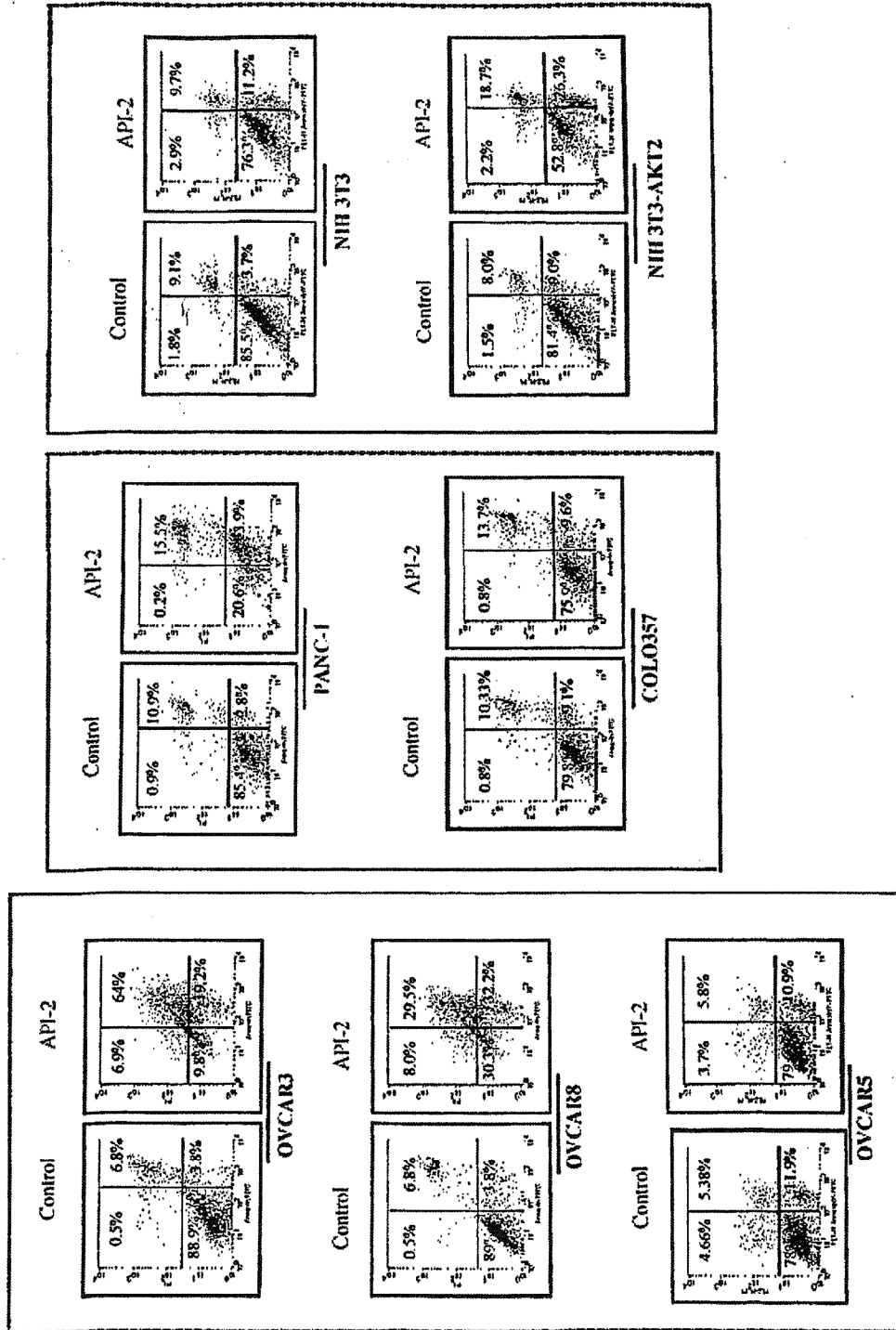


FIG. 3C



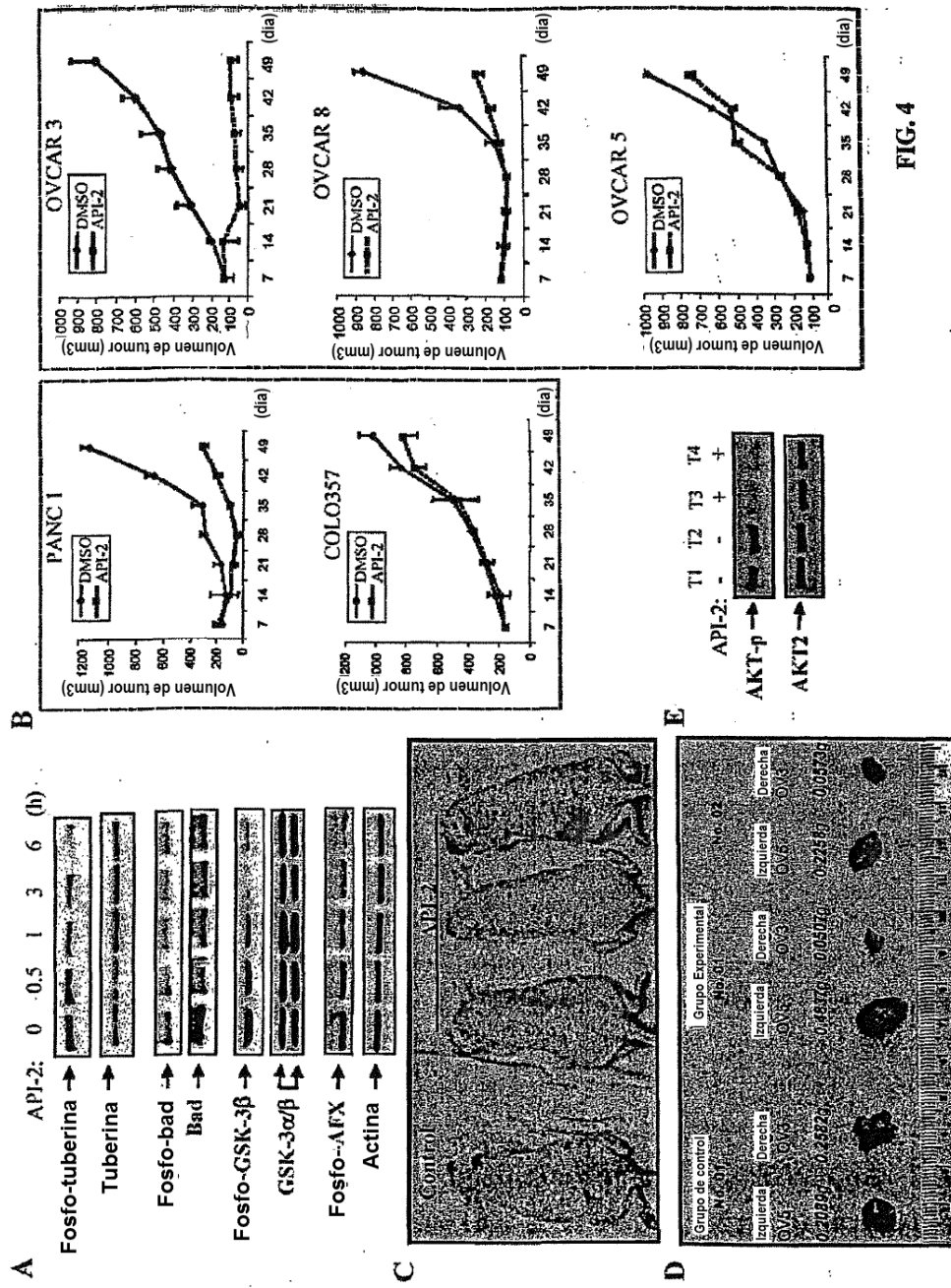


FIG. 4

PIP3:	-	+	+	+	+
PDK1:	-	+	+	+	+
Akt:	+	+	+	+	+
API-2:	-	-	-	25	10 (μ M)



FIG. 5

ES 2 629 682 T3

```

atgaacgacgtagccattgtgaaggagggtgggtgcacaaacgaggggaatatattaa
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
tacttgctgcatcggtaacacttctcccgcaccgacgtgtttgctccccttatataatt

a   M N D V A I V K E G W L H K R G E Y I K -

acctggcggccacgctacttctcctcaagaacgatggcacctttattggctacaaggaa
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
tggaccgcccgtgcatgaaggaggagttcttggctaccgtggaaataaccgatgttctt

a   T W R P R Y F L L K N D G T F I G Y K E -

cggcctcaggatgtggatcagcgagagtcctccactcaacaacttctcagtggcacaatgc
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
gccggagtccctacacctagtcgctctcaggggtgagttggtgaagagtcaccgtgttacg

a   R P Q D V D Q R E S P L N N F S V A Q C -

                                     PstI
                                     |
cagctgatgaagacagagcggccaaggcccaacacctttatcatccgctgctgcagtgg
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
gtcgactacttctgtctcgcgggttcggggttgggaaatagtaggcgacggacgtcacc

a   Q L M K T E R P R P N T F I I R C L Q W -

accacagtcattgagcgcaccttccatgtagaaaacgcctgaggagcgggaagaatgggcc
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
tgggtgtcagtaactcgcgtggaaggtacatctttgcggaactcctcgccttcttaccgg

a   T T V I E R T F H V E T P E E R E E W A -

accgccattcagactgtggccgatggactcaagaggcaggaagaagagacgatggacttc
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
tggcggtaagtctgacaccggctacctgagttctccgctccttcttctgctacctgaag

a   T A I Q T V A D G L K R Q E E E T M D F -

cgatcaggctcaccagtgacaactcaggggtgaagagatggaggtgtccctggccaag
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
gctagtccgagtggtcactggtgagtcctccgacttctctacctccacagggaccggttc

a   R S G S P S D N S G A E E M E V S L A K -

cccaagcaccgtgtgaccatgaacgagtttgagtacctgaaactactgggcaagggcacc
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
gggttcgtggcacactggtacttgctcaaactcatggactttgatgaccggtcccgtgg

a   P K H R V T M N E F E Y L K L L G K G T -

```

FIGURA 6a

ES 2 629 682 T3

```

461 ttrgggaaagtgattctggtaaaagagaaggyccacaggccgctactatgccatgaagatc
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
aaaccctttcactaagaccattttctcttccgggtgtooggcgatgatacggtaacttctag
a   F G K V I L V K E K A T G R Y Y A M K I -

541 ctcaagaaggaggtcatcgtcgccaaggatgaggttgcccacacgcttactgaaaacogt
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
gagttcttccctccagtagcagcggttcctactccaacgggtgtgcaatgacttttggca
a   L K K E V I V A K D E V A H T L T E N R -

      PstI

601 gtctgcagaactctagggcatcccttcttacggccctcaagtactcattccagaccac
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
caggacgtcttgagatccgtaggaaggaatgccgggagttcatgagtaagggtctgggtg
a   V L Q N S R H P F L T A L K Y S F Q T H -

                                   XhoI
                                   |
661 gaccgcctctgctttgtcatggagtatgccaacggggcgagctcttcttccacctgtct
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
ctggcgggagacgaaacagtacctatcaggttgccccgctcgagaagaagggtggacaga
a   D R L C F V M E Y A N G G E L F F H L S -

721 cgagagcgcgtgttctccgaggaocgggcccgttctatggtgcgagattgtgtctgcc
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
gctctcgcgcacaagaggctcctggcccggcggaagataccacgcctctaacacagacgg
a   R E R V F S E D R A R F Y G A E I V S A -

781 ctggactacttgcaactccgagaagaacgtgggtgtaccgggacctgaagctagagaacctc
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
gacctgatgaacgtgaggctcttcttgaccacatggccctggacttcgatctcttggag
a   L D Y L H S E K N V V Y R D L K L E N L -

841 atgctggacaaggacgggcacatcaagataacggacttcgggctgtgcaaggaggggatc
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
tacgacctgttctgcccgtgtagttctattgcctgaagcccgcacacgttccctccctag
a   M L D K D G H I K I T D F G L C K E G I -

901 aaggatggtgccactatgaagacattctgcggaacgcggagtaacctggcccctgaggtg
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
ttcctaccacgggtgatacttctgtaagacgccttggccctcatggaccggggactccac
a   K D G A T M K T F C G T P E Y L A P E V -

961 ctggaagacaacgactacggccgtgcagtggactggtggggctgggctggtcatgtat
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
gaccttctgttgctgatgccggcacgtcacctgaccacccccgaccgcaccagtacata
a   L E D N D Y G R A V D W W G L G V V M Y -

```

FIGURA 6b

ES 2 629 682 T3

```

gagatgatgtgtggccgctgccccttctacaaccaggaccaagagaagctgttcgagctg
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
ctctactacacaccggcggaagatgttggctcctggtgctcttcgacaagctcgac
a      E M M C G R L P F Y N Q D H E K L F E L -
      atcctcatggaggagatccgcttccogcgcacactcggccctgaggccaagtcctgctc
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
taggagtacctcctctaggcgaagggcgcggtgtgagccgggactccgggtcagggacgag
a      I L M E E I R F P R T L G P E A K S L L -
      tccgggctgctcaagahaggaccctacacagaggctcgggtgggggctctgaggatgccaa
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
aggccccgacgagttcttccctgggatgtgtctccgagccacccccgagactcctacggttc
a      S G L L K K D P T Q R L G G G S E D A K -
      gagatcatgcagcaccggttctttgccaacatcgtgtggcaggatgtgtatgagaagaag
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
ctctagtacgtcgtggccaagaaacggttgtagcacaccgtcctacacatactcttcttc
a      E I M Q H R F F A N I V W Q D V Y E K K -
      ctgagcccacctttcaagccccaggtcacctctgagactgacaccaggtatctcgatgag
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
gactcgggtggaaagttcggggtccagtgaggactctgactgtggtocataaagctactc
a      L S P P F K P Q V T S E T D T R Y F D E -
      gagttcacagctcagatgatcaccatcacgccgctgatcaagatgacagcatggagtg
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
ctcaagtgtcgagtctactagtgttagtgcgggcgactagttctactgtcgtacctcaca
a      E F T A Q M I T I T P P D Q D D S M E C -
      gtggacagtgageggaggccgcacttccccagttctcctactcagccagtgggcacagcc
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
cacctgtcactcgcctccggcggtgaagggggtcaagaggatgagtcgggtcaccgtgtcgg
a      V D S E R R P H F P Q F S Y S A S G T A -
      tga
1441 --- 1443
      act
a      * -

```

FIGURA 6c

ES 2 629 682 T3

```

ATGAATGAGGTGTCTGTCATCAAAGAAGGCTGGCTCCACAAGCGTGGTGAATACATCAAG
328 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 387
TACTTACTCCACAGACAGTAGTTTCTTCCGACCGAGGTGTTCCGACCACTTATGTAGTTC

a   M N E V S V I K E G W L H K R G E Y I K -

ACCTGGAGGCCACGGTACTTCTGCTGAAGAGCGACGGCTCCTTCATTGGGTACAAGGAG
388 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 447
TGGACCTCCGGTGCCATGAAGGACGACTTCTGCTGCCGAGGAAGTAACCCATGTTCCTC

a   T W R P R Y F L L K S D G S F I G Y K E -

AGGCCCGAGGCCCTGATCAGACTCTACCCCCCTTAAACRACTTCTCCGTAGCAGAATGC
448 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 507
TCCGGGCTCCGGGGACTAGTCTGAGATGGGGGAATTTGTTGAAGAGGCATCGTCTTACG

a   R P E A P D Q T L P P L N N F S V A E C -

PstI
      |
CAGCTGATGAAGACCGAGAGGCCGCGACCCAACACCTTTGTCATACGCTGCCTGCAGTGG
508 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 567
GTCGACTACTTCTGGCTCTCCGGCGCTGGGTTGTGGAAACAGTATGCCGACGGACGTCACC

a   Q L M K T E R P R P N T F V I R C L Q W -

ACCACAGTCATCGAGAGGACCTTCCACGTGGATTCTCCAGACGAGAGGGAGGAGTGGATG
568 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 627
TGGTGTACAGTAGCTCTCCTGGAAGGTGCACCTAAGAGGTCTGCTCTCCCTCCTCACCTAC

a   T T V I E R T F H V D S P D E R E E W M -

ApaI
      |
CGGGCCATCCAGATGGTCCGCAACAGCCTCAAGCAGCGGGGCCCCAGGCGAGGACCCCATG
628 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 687
GCCCGGTAGGTCTACCAGCGGTTGTCCGAGTTTCGTCGCCCCGGGTCCGCTCCTGGGGTAC

a   R A I Q M V A N S L K Q R A P G E D P M -

GACTACAAGTGTGGCTCCCCAGTGACTCCTCCACGACTGAGGAGATGGAAGTGGCGGTC
688 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 747
CTGATGTTACACCGAGGGGGTCACTGAGGAGGTGCTGACTCCTCTACCTTCACCGCCAG

a   D Y K C G S P S D S S T T E E M E V A V -

AGCAAGGCACGGGCTAAAGTGACCATGAATGACTTCGACTATCTCAAACCTCCTTGGCAAG
748 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 807
TCGTTCCGTGCCCGATTCACTGGTACTTACTGAAGCTGATAGAGTTTGAGGAACCGTTC

```

FIGURA 7a

ES 2 629 682 T3

```

a      S K A R A K V T M N D F D Y L K L L G K -
      GGAACCTTTGGCAAAGTCATCCTGGTGC GGGAGAAGGCCACTGGCCGCTACTACGCCATG
808  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 867
      CCTTGGAAACCGTTTCAGTAGGACCACGCCCTCTCCGGTGACCGCGATGATGCGGTAC

a      G T F G K V I L V R E K A T G R Y Y A M -
      AAGATCCTGCGAAAGGAAGTCATCATTGCCAAGGATGAAGTCGCTCACACAGTCACCCGAG
868  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 927
      TTCTAGGACGCTTTCCCTTCAGTAGTACGGTTCCCTACTTCAGCGAGTGTGTAGTGGCTC

a      K I L R K E V I I A K D E V A H T V T E -
      AGCCGGGTCTCCAGAACCACCGGCCACCCGTTCCCTCACTGCGCTGAAGTATGCCTTCCAG
928  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 987
      TCGGCCCAGGAGTCTTGTGGTCCGTTGGGCAAGGAGTGACCGGACTTCATACGGAAGTTC

a      S R V L Q N T R H P F L T A L K Y A F Q -
      ACCCAGCACCGCCTGTGCTTTGTGATGGAGTATGCCAACGGGGTGAGCTGTTCTTCCAC
988  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1047
      TGGGTGCTGGCGGACACGAAACTACCTCATACGGTTGCCCCCACTCGACAAGAAGGTG

a      T H D R L C F V M E Y A N G G E L F F H -
      SmaI
      XmaI |                               ApaI
      | |                               |
1048  CTGTCCC GGGAGCGTGTCTTCACAGAGGAGCGGGCCCGGTTTATGGTGCAGAGATTGTG
      ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1107
      GACAGGGCCCTCGCACAGAAGTGTCTCCTCGCCCGGGCCAAAATACCACGTCTCTAACAG

a      L S R E R V F T E E R A R F Y G A E I V -
      FCGGCTCTTGAGTACTTGCACTCGCGGGACGTGGTATACCGCGACATCAAGCTGGAAAAC
1108  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1167
      AGCCGAGAACTCATGAACGTGAGCGCCCTGCACCATATGGCGCTGTAGTTCGACCTTTTG

a      S A L E Y L H S R D V V Y R D I K L E N -
      CTCATGCTGGACAAAGATGGCCACATCAAGATCACTGACTTTGGCCTCTGCAAAGAGGGC
1168  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1227
      GAGTACGACCTGTTCTACCGGTGTAGTTCTAGTGACTGAAACCGGAGACGTTTCTCCCG

a      L M L D K D G H I K I T D F G L C K E G -
      ATCAGTGACGGGGCCACCATGAAAACCTTCTGTGGGACCCCGGAGTACCTGGCGCCTGAG
1228  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1287
      TAGTCACTGCCCCGGTGGTACTTTTGAAGACACCCTGGGGCCTCATGGACCGCGGACTC

a      I S D G A T M K T F C G T P E Y L A P E -
      GTGCTGGAGGACAATGACTATGGCCGGCCGTTGGACTGGTGGGGGCTGGGTGTGGTCATG
1288  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1347
      CACGACCTCCTGTTACTGATACCGGCCCGGCACCTGACCACCCCGACCCACACCAGTAC

```

FIGURA 7b

1820 ---+-----+- 1842
AAATGGGGACGGCC
a F T P A R -

FIGURA 7d

ES 2 629 682 T3

```

1  gggctcagaggggagtcacatgagcgatggtaccattgtgaaagaaggttgggttcaga
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
c   A Q R G V I M S D V T I V K E G W V Q K -
61  agaggggagaatataaaaaactggaggccaagatacttcttttgaagacagatggct
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
c   R G E Y I K N W R P R Y F L L K T D G S -
121 cattcataggatataaagagaaacctcaagatgtggatttaccttatccctcaacaact
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
c   F I G Y K E K P Q D V D L P Y P L N N F -
181 tttcagtggaatgccaagtaataaagaaacagaaacgaccaaagccaaacacatttataa
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
c   S V A K C Q L M K T E R P K P N T F I I -
241 tcagatgtctccagtgactactgttatagagagaacatttcatgtagatactccagagg
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
c   R C L Q W T T V I E R T F H V D T P E E -
                                     PstI
                                     |
301 aaaggaagaatggacagaagctatccaggctgtagcagacagactgcagaggcaagaag
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
c   R E E W T E A I Q A V A D R L Q R Q E E -
361 aggagagaatgaattgtagtccaacttcacaaattgataatagaggaggaagagatgg
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
c   E R M N C S P T S Q I D N I G E E E M D -
421 atgccttacaacccatcataaaagaaagacaatgaatgattttgactatttgaaactac
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
c   A S T T H H K R T M N D F D Y L K L L -

```

FIGURA 8a

ES 2 629 682 T3

```

taggtaaaggcacttttgggaaagtattttggttcgagagaaggcaagtggaaaact-
481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
atccatttcogtgaaaaccctttcaataaaaccaagctctcttcogttcaccttttatga

c      G K G T F G K V I L V R E K A S G K Y Y -

atgctatgaagattctgaagaaagaagtcattattgcaaaggatgaagtggcacacactc
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
tacgatacttctaagacttctttcttcagtaataacgtttctacttcaccogtgtgtgag

c      A M K I L K K E V I I A K D E V A H T L -

taactgaaagcagagpattaaagaacactagacatccctttttaacatccttgaaatatt
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
attgactttcgtctcataatitctgtgatctgttagggaaaaattgtaggaactttataa

c      T E S R V L K N T R H P F L T S L K Y S -

ccttcagacaaaagaccggtttgtgttttgtgatggaatatgttaatggggcgagctgt
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
ggaaggtctgttttctggcaaacacaaaacactacottatacaattacccccgctcgaca

c      F Q T K D R L C F V M E Y V N G G E L F -

ttttccatttgcgagagagcggtgttctctgaggaccgcacacgtttctatgggtgcag
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
aaaaggtaaacagctctctogcccacaagagactcctggcggtgtgcaaagataaccagtc

c      F H L S R E R V F S E D R T R F Y G A E -

aaattgtctctgccttggactatctacattccggaaagattgtgtaccogtcatctcaagt
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
tttaacagagacggaacctgatagatgtaaggcctttctaacacatggcactagagttca

c      I V S A L D Y L H S G K I V Y R D L K L -

tggagaatctaagtctggacaaagatggccacataaaaattacagattttggactttgca
841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900
acctcttagattacgacctgtttctaccggtgtattttaatgtctaaaacctgaaacct

c      E N L M L D K D G H I K I T D F G L C K -

aagaagggatcacagatgcagccaccatgaagacattctgtggcactccagaatatctgg
901 -----+-----+-----+-----+-----+ 960
ttcttccttagtgtctacgtcggtggtacttctgtaagacaccgtgaggtcttatagacc

c      E G I T D A A T M K T F C G T P E Y L A -

caccagaggtgttagaagataatgactatggccgagcagtagactggtggggccttagggg
961 -----+-----+-----+-----+-----+ 1020
gtggtctccacaatcttctattactgataccggctogtcatctgaccaccccgatcccc

c      P E V L E D N D Y G R A V D W W G L G V -

ttgtcatgtatgaaatgatgtgtgggaggttacctttctacaaccaggaccatgagaaac
1021 -----+-----+-----+-----+-----+ 1080

```

FIGURA 8b

ES 2 629 682 T3

```

aacagtacatactttactacacacctccaatggaaagatggtggctctggctactctttg
c      V M Y E M M C G R L P F Y N Q D H E K L -
      tttttgaattaatattaatggaagacattaaatctcctcgaacactctcttcagatgcaa
1081 -----+-----+-----+-----+-----+ 1140
      aaaaacttaattataattaccttctgtaatttaaggagcttgtagagaagtctacggt
c      F E L I L M E D I K F P R T L S S D A K -
      BamHI
      |
      aatcattgctttcagggctcttgataaaggatccaaataaacgccttggtggaggaccag
1141 -----+-----+-----+-----+-----+ 1200
      ttagtaacgaaagtcccgagaactattccttaggtttatttgcggaaccacctcctggtc
c      S L L S G L L I K D P N K R L G G G P D -
      atgatgcaaaagaaattatgagacacagtttcttctctggagtaaactggcaagatgtat
1201 -----+-----+-----+-----+-----+ 1260
      tactacgttttctttaataactctgtgtcaaagaagagacctcatttgaccggtctacata
c      D A K E I M R H S F F S G V N W Q D V Y -
      HindIII
      |
      atgataaaaagcttgtagctcctcttttaaacctcaagtaacatctgagacagatactagat
1261 -----+-----+-----+-----+-----+ 1320
      tactatctttcgaacatggaggaaaatttggagttcattgtagactctgtctatgatcta
c      D K K L V P P F K P Q V T S E T D T R Y -
      attttgatgaagaatttacagctcagactattacaataacaccacctgaaaaatgatg
1321 -----+-----+-----+-----+-----+ 1380
      taaaactacttcttaaatgtcaggtctgataatggtattgtggtggactttttatactac
c      F D E E F T A Q T I T I T P P E K Y D E -
      NotI
      |
      aggatggtatggactgcatggacaatgagaggcggccgcatttcctcaattttcctact
1381 -----+-----+-----+-----+-----+ 1440
      tcctaccatacctgacgtacctgtaactctccgcccgcgtaaaggagttaaaggatga
c      D G M D C M D N E R R P H F P Q F S Y S -
      ctgcaagtggacgagaataagtctctttcattctgctacttcactgtcatcttcaattta
1441 -----+-----+-----+-----+-----+ 1500
      gacggtcacctgctcttattcagagaaagtaagacgatgaagtgacagtagaagttaaat
c      A S G R E * V S F I L L L H C H L Q F I -
      ttactgaaaa
1501 -----+ 1510
      aatgactttt
c      T E -

```

FIGURA 8c