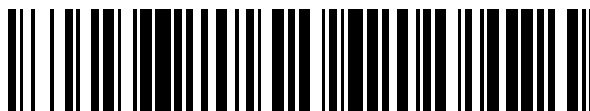


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 562**

51 Int. Cl.:

A61K 31/275 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

C07C 321/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2009 PCT/US2009/046143**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2009 WO09149192**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2009 E 09759351 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2299999**

54 Título: **Inhibidores de STAT3**

30 Prioridad:

04.06.2008 US 58742 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2017

73 Titular/es:

**BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE (100.0%)
One Baylor Plaza
Houston, TX 77030-3411, US**

72 Inventor/es:

**TWEARDY, DAVID, J.;
KASEMBELI, MOSES, M. y
XU, XUEJUN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

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

ES 2 647 562 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

Inhibidores de STAT3

Campo técnico

5 La presente invención se refiere generalmente al menos a los campos de la biología computacional, la biología celular, la biología molecular, la biología y la medicina del cáncer.

Antecedentes de la invención

10 El transductor de señal y activador de la transcripción 3 (Stat3) es un oncogén (Bromberg et al., 1999) y uno de los siete miembros de la familia de las proteínas STAT, que son intermediarios de señalización que median las acciones de muchas citoquinas y factores de crecimiento. Stat3 es constitutivamente activo en muchos tipos diferentes de cáncer incluyendo

15 próstata, mama, pulmón, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, mieloma múltiple, cáncer de colon, carcinomas hepatocelulares y gran leucemia linfocítica granular (Turkson and Jove 2000; Dong et al., 2003; Kortylewski et al., 2005; Lin et al., 2005; Twardy and Redell 2005; Redell and Twardy 2006). Además, los estudios de xenoinjertos de tumores humanos en ratones han demostrado repetidamente que la inhibición de Stat3 produce una disminución del crecimiento tumoral y una supervivencia animal mejorada (Redell and Twardy 2006) induciendo la apoptosis en células

20 tumorales, inhibiendo la angiogénesis (Kato et al., 2004) y mejorando la citotoxicidad inmunomediada antitumoral (Dunn et al., 2002; Kortylewski et al., 2005). De este modo, Stat3 ha sido identificado como una diana potencialmente de alto rendimiento para el desarrollo de fármacos para tratar muchos cánceres (Yu and Jove 2004; Darnell 2005).

25 En contraste con Stat3, Stat1 es antioncogénico; es un potente inhibidor del crecimiento tumoral y promotor de la apoptosis (Bromberg et al., 1999). También, debido a que los tumores de animales de tipo salvaje tratados con carcinógenos crecen más rápidamente cuando se trasplantan a los animales deficientes en Stat1 que en un huésped de tipo salvaje, Stat1 contribuye a la vigilancia de tumores (Kaplan et al., 1998). Por consiguiente, una meta altamente deseable en el desarrollo de fármacos que se dirigen a Stat3 es la selectividad para Stat3 frente a Stat1, por ejemplo.

30 Se han desarrollado fármacos que se dirigen selectivamente Stat3 frente a Stat1 (Bhasin et al., 2007; Jing et al., 2004; Coleman et al., 2005; Song et al., 2005; Schust et al., 2006; Siddiquee et al., 2007). Sin embargo, la determinación de su selectividad se estableció empíricamente después de su identificación como inhibidores de Stat3 y no se incorporó en el proceso de cribado. Existe una necesidad en la técnica de proporcionar nuevos compuestos y métodos de inhibición de Stat3 selectivamente.

35 Los documentos WO2006/069001 y US2006/148715 del solicitante se refieren a inhibidores de Stat3 y describen un compuesto (ID-7682533) correspondiente al Com 3-7 descrito a continuación.

40 Resumen de la invención

Aspectos de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

45 Stat3 es un oncogén constitutivamente activado en muchos sistemas de cáncer donde contribuye a la carcinogénesis. Descrito en el presente documento, hay un enfoque de cribado virtual de ligandos de moléculas pequeñas que dirige el bolsillo de unión del péptido pY del dominio SH2 de Stat3 en tres sitios, incluyendo, por ejemplo, un bolsillo hidrófobo, que sirve como filtro de selectividad. Este enfoque identificó por primera vez nuevos compuestos de plomo que inhiben competitivamente la unión de Stat3 a su ligando del péptido pY, que son selectivos para Stat3 frente a Stat1 y que inducen también apoptosis preferencialmente de líneas celulares de cáncer de mama de ejemplo con Stat3 activado constitutivamente. Un compuesto (Com188) era activo en el intervalo nanomolar. Además de producir compuestos que selectivamente se dirigen a Stat3 por diseño, la presente divulgación es útil para identificar sondas químicas selectivas

50 de otros miembros de la familia de las proteínas STAT, especialmente Stat5A/B, por ejemplo, que también ha estado implicado en carcinogénesis. Además de producir compuestos que dirigen selectivamente Stat3 por diseño, el enfoque de la invención es útil para identificar sondas químicas selectivas de otros miembros de la familia de las proteínas STAT.

55 La presente invención es particularmente útil dado el número de sistemas de tumores en los que Stat3 contribuye a la oncogénesis, así como demostraciones recientes de que tirosina quinasas asociadas a múltiples receptores y asociadas a no receptores están activadas en un único tumor. Los agentes que dirigen a Stat3, a un punto de convergencia de señalización para múltiples quinasas oncogénicas, son más ampliamente útiles en el tratamiento contra el cáncer que los agentes dirigidos a las oncogénicas quinasas individuales, en ciertos casos.

60 Para desarrollar sondas químicas que se dirigen selectivamente a Stat3, se cribaron 920,000 pequeños compuestos similares a fármacos al acoplar cada uno de ellos en el bolsillo de unión del péptido del dominio SH2 de Stat3, que consiste en tres sitios: el sitio de unión del residuo pY, el sitio de unión del residuo +3 y un sitio de unión hidrófobo, que

5 sirvió como filtro de selectividad. Tres compuestos de ejemplo e ilustrativos satisfacían criterios de análisis de interacción, inhibían competitivamente la unión de Stat3 recombinante a su ligando del péptido pY inmovilizado e inhibían la fosforilación de tirosina mediada por IL-6 de Stat3. Estos compuestos se usaron en una criba de similitud de 2.47 millones de compuestos, los cuales identificaron 3 compuestos más activos con actividades similares. El examen de los 6 compuestos activos para determinar la capacidad para inhibir la fosforilación de Stat1 mediada por IFN- γ reveló que 5 de 6 eran selectivos para Stat3. La secuencia y la comparación estructural 3-D de los dominios SH2 de Stat3 y Stat1 unidos al compuesto revelaron que la interacción del compuesto con el sitio de unión hidrófobo era la base para la selectividad. Los 5 compuestos selectivos inhibieron la translocación del núcleo al citoplasma de Stat3, mientras que 3 de 5 compuestos indujeron apoptosis preferencialmente de líneas celulares de cáncer de mama con activación constitutiva de Stat3. De este modo, el cribado virtual de ligandos de bibliotecas de compuestos que dirigieron el bolsillo de unión del Stat3 péptido pY identificó por primera vez 3 compuestos de plomo que inhiben competitivamente la unión de Stat3 a su ligando del péptido pY; estos compuestos fueron selectivos para Stat3 frente a Stat1 e indujeron apoptosis preferencialmente de líneas celulares de cáncer de mama con Stat3 activado constitutivamente.

15 En algunos casos, los métodos y/o composiciones descritos en este documento son útiles para inhibir la actividad de Stat3. En casos específicos, los métodos y/o composiciones de la invención se emplean para inducir la apoptosis en una célula cancerosa, inhibir la angiogénesis en un tumor, mejorar la citotoxicidad inmunomediada antitumoral, disminuir el crecimiento tumoral, mejorar la supervivencia animal, inhibir la fosforilación de Stat3 y/o la translocación de núcleo a citoplasma de Stat3. En ciertos casos, los inhibidores de Stat3 inhiben Stat3, pero no inhiben Stat1. En algunos casos, los inhibidores de Stat3 de la invención interactúan con el dominio SH2 de Stat3, inhiben competitivamente la unión de Stat3 recombinante a su ligando del péptido pY inmovilizado, y/o inhiben la fosforilación de tirosina mediada por IL-6 de Stat3, por ejemplo. En particular, el inhibidor de Stat3 de la invención cumple los criterios de análisis de interacción (CIA): 1) puntuación de energía mínima total ≤ -30 ; 2) formación de una red de puentes salinos y/o de enlaces H en el sitio de unión del residuo pY de Stat3; y/o 3) formación de un enlace de H con o bloqueando el acceso al hidrógeno de amida de E638 de Stat3, por ejemplo. En algunos casos, el inhibidor de Stat3 interactúa con un bolsillo de enlace hidrófobo con el dominio SH2 de Stat3.

25 En realizaciones específicas, el cáncer tratado por la invención puede ser cualquier tipo de cáncer, aunque en realizaciones específicas el cáncer comprende células que tienen Stat3 fosforilado constitutivamente o una expresión de proteína Stat3 aumentada. En algunos casos, el cáncer puede ser del pulmón, mama, piel, hígado, riñón, testículos, ovario, cuello uterino, hueso, bazo, vesícula biliar, cerebro, páncreas, estómago, ano, próstata, colon o sangre, por ejemplo; El inhibidor puede inhibir Stat3 en una célula madre cancerosa de cualquiera de estos cánceres. En otras realizaciones, se trata una enfermedad hiperproliferativa tal como una enfermedad linfoproliferativa después del trasplante o una restenosis. En otra realización, se trata la fibrosis pulmonar. En otras realizaciones, se trata el asma o una enfermedad inflamatoria intestinal.

30 Se describen en este documento, por ejemplo, métodos de identificación de inhibidores de otros miembros de la familia de las proteínas STAT, incluyendo STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 (STAT5A y STAT5B), y STAT6.

35 Lo anterior ha descrito más bien ampliamente las características y ventajas técnicas de la presente invención con el fin de que la descripción detallada de la invención que sigue se pueda comprender mejor. A continuación, se describirán características y ventajas adicionales de la invención que forman el objeto de las reivindicaciones de la invención. Se debe apreciar por los expertos en el arte que la concepción y la realización específica descrita pueden ser fácilmente utilizadas como base para modificar o diseñar otras estructuras para llevar a cabo los mismos propósitos de la presente invención. También se debe comprender por los expertos en el arte que tales construcciones equivalentes no se apartan del espíritu y alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las nuevas características que se cree que son características de la invención, tanto en cuanto a su organización como a su modo de funcionamiento, junto con otros objetos y ventajas, se comprenderán mejor a partir de la siguiente descripción cuando se considere en relación con las figuras adjuntas. Sin embargo, se debe entender expresamente que cada una de las figuras se proporciona únicamente con fines de ilustración y descripción y no se pretende que sea una definición de los límites de la presente invención.

Descripción de los dibujos

40 La figura 1 demuestra la inhibición de la unión de Stat3 al ligando fosfopéptido inmovilizado por los compuestos. La unión de Stat3 recombinante (500 nM) a un chip sensor BiaCore recubierto con un fosfododecapéptido basado en la secuencia de aminoácidos que rodea a Y1068 dentro del EGFR se midió en tiempo real mediante SPR (unidades de respuesta) en ausencia (0 μ M) o presencia de concentraciones crecientes (0.1 a 1,000 μ M) de Com3 (panel A, no reivindicado), Com30 (panel B), Com188 (panel C), Com3-2 (panel D, no reivindicado), Com3-7 (panel E, no reivindicado) y Com30-12 (panel F). Los datos mostrados son representativos de 2 o más experimentos. Se normalizaron los niveles de enlace en equilibrio obtenidos en ausencia o presencia de compuestos (respuesta obtenida en presencia del compuesto \div la respuesta obtenida en ausencia del compuesto \times 100), se representa frente a la concentración log (nM) de los compuestos (panel G). Los puntos experimentales se ajustan a una curva de unión

competitiva que utiliza una ecuación logística de cuatro parámetros (véanse los métodos de ejemplo para detalles). Estas curvas se usaron para calcular IC_{50} (Tabla 1).

5 La figura 2 demuestra la inhibición de la activación mediada por IL-6 de Stat3 por compuestos. Se trataron previamente las células HepG2 con DMSO solo o DMSO que contenía Com3 (panel A, no reivindicado), Com188 (panel B), Com30 (panel C), Com3-2 (panel D, no reivindicado), Com3-7 (panel E, no reivindicado) o Com30-12 (panel F) a la concentración indicada durante 60 min. A continuación, las células fueron estimuladas con IL-6 (30 ng/ml) durante 30 min. Los extractos de proteínas de las células se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron y se desarrollaron en serie con anticuerpos contra pStat3, Stat3 total y β -actina. Se desmontaron las transferencias entre cada sonda de anticuerpos. Las intensidades de bandas de inmunotransferencia se cuantificaron por densitometría. El valor de cada intensidad de la banda pStat3 se dividió por cada valor correspondiente de la intensidad de la banda Stat3 total y los resultados se normalizaron al valor de control tratado con DMSO y se representan como una función de la concentración log del compuesto. Las curvas de ajuste óptimo se generaron basándose en el software IDBS, 4-Parameter LogisticModel/Dose Response/XLfit 4.2. Cada panel es representativo de 3 o más experimentos.

15 La figura 3 proporciona fórmulas químicas de ejemplo y nombres de compuestos. Las fórmulas y nombres químicos se indican para Com3 (panel A, no reivindicado), Com30 (panel B), Com188 (panel C), Com3-2 (panel D, no reivindicado), Com3-7 (panel E, no reivindicado) Y Com30-12 (panel F).

20 La figura 4 muestra el efecto de los compuestos sobre la activación de Stat1. Se trataron previamente células HepG2 con DMSO solo o DMSO conteniendo cada uno de los compuestos a una concentración de 300 μ M durante 60 min. Las células fueron estimuladas con IFN- γ (30 ng/ml) durante 30 min. Los extractos de proteínas de las células se separaron por SDS-PAGE y se inmunotransferieron en serie con anticuerpos contra pStat1, Stat1 total y β -actina. Las transferencias se retiraron entre cada inmunotransferencia. Los resultados mostrados son representativos de 2 o más experimentos.

25 La figura 5 proporciona comparaciones de las secuencias de dominio SH2 de Stat3 y Stat1, estructuras 3-D y energías de van der Waals de unión a compuestos. La alineación de la secuencia de los dominios SH2 de Stat3 y Stat1 se muestra en el panel A. Los residuos que se unen al residuo pY se destacan y señalan por una flecha sólida, el residuo (E638) que se une al residuo +3 se destaca y señala por una flecha punteada y el Bucle $_{\beta C-\beta D}$ y el Bucle $_{\alpha B-\alpha C}$, que comprenden el sitio de unión hidrófobo que consiste, se destacan y señalan por flechas punteadas y discontinuas, respectivamente. El panel B muestra una superposición de un modelo de superficie de van der Waals de tubo y niebla del dominio SH2 de Stat3 y un modelo de superficie Van der Waals de tubo y niebla del SH2 de Stat1. Los residuos del dominio SH2 de Stat3 representan Bucle $_{\beta C-\beta D}$ se destacan y se muestran mediante círculos punteados y los residuos representan Bucle $_{\alpha B-\alpha C}$ se destacan y se muestran con un círculo discontinuo; los residuos de bucle correspondientes dentro del dominio SH2 de Stat1 se muestran en una niebla ligera que rodea los círculos. Esta superposición se muestra unida por Com3-7 (no reivindicado) como se uniría al dominio SH2 de Stat3. La energía de van der Waals de cada compuesto unido al dominio SH2 de Stat1 o al dominio SH2 de Stat3 se calculó, normalizó al valor para Stat1 y se representó en el panel C.

30 La figura 6 muestra un modelo informático de cada compuesto unido por el dominio SH2 de Stat3. Los resultados de acoplamiento de ordenador al dominio SH2 de Stat3 se muestran para Com3 (panel A, no reivindicado), Com30 (panel B), Com188 (panel C), Com3-2 (panel D, no reivindicado), Com3-7 (panel E, no reivindicado) y Com30-12 (panel F). La imagen a la izquierda de cada panel muestra el compuesto que se une a un modelo de relleno de espacio del dominio SH2 de Stat3. El sitio de unión del residuo pY está representado por un círculo discontinuo, el sitio de unión del residuo +3 está representado por un círculo sólido, el bucle Bucle $_{\beta C-\beta D}$ está representado por un círculo punteado y el bucle Bucle $_{\alpha B-\alpha C}$ está representado por círculo punteado. Los residuos R609 y K591 críticos para la unión de pY se muestran dentro de un círculo discontinuo, el residuo E638 que se une al residuo +3 mostrado dentro de un círculo sólido y se muestra el sitio de unión hidrófobo que consiste en Bucle $_{\beta C-\beta D}$ y Bucle $_{\alpha B-\alpha C}$ dentro de un círculo discontinuo y punteado, respectivamente. La imagen en el lado derecho de cada panel es una vista más cercana de esta interacción con enlaces de hidrógeno indicados por líneas punteadas. En la figura 6A, la unidad estructural de ácido benzoico cargada negativamente de Com3 (no reivindicado) tiene interacciones electrostáticas con el sitio de unión del residuo pY de carga positiva que consiste principalmente del grupo catión guanidinio de R609 y el grupo amonio básico de K591. El grupo ácido benzoico también forma una red de enlaces de hidrógeno que consiste en enlaces H dobles entre el oxígeno carboxílico y el hidrógeno amónico de R609 y el hidrógeno de amida de E612. La formación de enlaces H también ocurre entre el oxígeno de carbonilo de ácido benzoico y el hidrógeno de hidroxilo de cadena lateral de Serina 611. Dentro del sitio de unión del residuo +3, el átomo de oxígeno de 1,4-benzodioxina forma un enlace de hidrógeno con el hidrógeno de amida de E638. Además, la 2,3-dihidro-1,4-benzodioxina de Com3 (no reivindicado) interactúa con los bucles que forman el sitio de unión hidrófobo. En la figura 6B, el extremo carboxílico de la unidad estructural ácido benzoico de Com30, que está cargado negativamente en condiciones fisiológicas, forma un puente salino con el grupo guanidinio de R609 en el sitio de unión del residuo pY. Dentro del sitio de unión del residuo +3, el oxígeno del grupo

5 tiazolidina forma un enlace de H con el hidrógeno de amida del esqueleto peptídico de E638. Además, la unidad estructural de tiazolidina se sumerge en el sitio de unión hidrófobo. En la figura 6C hay una interacción electrostática entre la unidad estructural (carboximetil) tio de Com188 que lleva una carga negativa y el sitio de unión del residuo pY que consiste en R609 y K591 que llevan carga positiva en condiciones fisiológicas. Existen enlaces H entre el oxígeno de hidroxilo del grupo (carboximetil)tio de Com188 y el hidrógeno de guanidinio de R609, entre el oxígeno de hidroxilo del grupo (carboximetil)tio y el hidrógeno de amida del esqueleto de E612, y entre el oxígeno de carboxilo del grupo (carboximetil)tio de Com188 y el hidrógeno de hidroxilo de S611. Dentro del sitio de unión del residuo +3, existe un enlace de H entre el oxígeno de hidroxilo del grupo ácido benzoico de Com188 y el hidrógeno de amida de E638. Además, el grupo ácido benzoico se extiende e interactúa con el sitio de unión hidrófobo. En la figura 6D, el grupo ácido benzoico del Com3-2 (no reivindicado) tiene interacciones electrostáticas significativas con el bolsillo del sitio de unión del residuo pY, aportada principalmente por R609 y K591, y forma dos enlaces H; el oxígeno carboxílico del grupo ácido benzoico se une al hidrógeno de guanidinio de R609, y el oxígeno de carbonilo del grupo ácido benzoico se une al hidrógeno de carbonilo de S611. Dentro del sitio de unión del residuo +3, el oxígeno dentro del grupo 1,3-dihidro-2H-inden-2-ilideno forma un enlace de H con el hidrógeno de amida del esqueleto de E638. Además, el grupo 1,3-dihidro-2H-inden-2-ilideno se sumerge en el sitio de unión hidrófobo. En la figura 6E se forman enlaces H entre el oxígeno de carbonilo de la unidad estructural 4-benzoato de metilo de Com 3-7 y el guanidinio de cadena lateral de R609 y entre el metoxi-oxígeno y el hidrógeno del extremo de amonio de K591. El grupo (2-metoxi-2-oxoetil) -4,8-dimetil-2-oxo-2H-cromeno de Com3-7 (no reivindicado) bloquea el acceso al hidrógeno de amida de E638 en el sitio de unión del residuo +3. Además, este grupo se sumerge en el sitio de unión hidrófobo. En la figura 6F hay interacciones electrostáticas entre el grupo derivado del ácido benzoico de Com30-12 y R609 y 591 en el sitio de unión del residuo pY. También, se forman enlaces H entre el oxígeno de hidroxilo de Com30-12 y el hidrógeno de guanidinio de R609, entre el oxígeno de carboxilo de Com30-12 y el hidrógeno de hidroxilo de S611 y entre el grupo de furilo de Com30-12 y el hidrógeno del amonio de K591. Los grupos 1,3-dietil-4,6-dioxo-2-tioxotetrahidro-5 (2H)-pirimidinilideno bloquea el acceso al sitio de unión del residuo +3; sin embargo, se extiende en la ranura entre el sitio de unión del residuo pY y Bucle β C- β D, mientras se preserva el sitio de unión hidrófobo.

La figura 7 muestra la inhibición de la translocación citoplasma al núcleo de Stat3 evaluada por microscopía de fluorescencia de alto rendimiento y confocal. En el panel A, se trataron previamente las células MEF/GFP-Stat3 cultivadas en cubreobjetos con DMSO que ya sea contenían (fila cuatro) o no contenían (fila tres) Com3 (no reivindicado) (300 μ M) durante 60 minutos antes de ser estimulados sin (fila uno) o con IL-6 (200 ng/ml) e IL-6sR (250 ng/ml) durante 30 minutos (filas dos, tres y cuatro). Los cubreobjetos fueron examinados por microscopía fluorescente confocal usando filtros para detectar GFP (columna uno), DAPI (columna dos) o ambos (combinación, columna tres). En el panel B, se cultivaron células MEF-GFP-Stat3 en placas de 96 pozos con fondos de vidrio óptico y se trataron previamente con el compuesto indicado a las concentraciones indicadas por cuadruplicado durante 1 hora, luego se estimularon con IL-6 (200 ng/ml) e IL-6sR (250 ng/ml) durante 30 minutos. Las células se fijaron y las placas se examinaron mediante microscopía de alto rendimiento para determinar la intensidad de fluorescencia en el núcleo (FLIN) y el % Δ de FLIN_{Max} se calculó como se describe en el ejemplo 1. Los datos mostrados son la media \pm SD y son representativos de 2 o más estudios. Las curvas de ajuste óptimo se generaron basándose en software IDBS, 4 Parameter LogisticModel/Dose Response/XLfit 4.2 y se usaron para calcular IC₅₀ (Tabla 1).

La figura 8 demuestra la inhibición de la unión del ADN Stat3 mediante los compuestos. Los ensayos de cambio de movilidad electroforética se realizaron usando extractos de células enteras preparados a partir de células HepG2 sin y con estimulación con IL-6 (30 ng/ml) durante 30 min. La proteína (20 μ g) se incubó con oligonucleótido dúplex radiomarcado (hSIE) y DMSO sin o con los compuestos indicados (300 μ M) durante 60 minutos a 37°C y después se separó mediante PAGE. El gel se secó y se autoradiografió; se muestra la parte del gel correspondiente a la banda de hSIE unido a Stat3. Los datos mostrados son representativos de 2 estudios.

La figura 9 demuestra la inducción de la apoptosis de líneas celulares de cáncer de mama por compuestos; apoptosis selectiva de líneas celulares que son dependientes de Stat3. Se sembraron MDA-MB-468 (panel A), MDA-MB-231 (panel B), MDA-MB-435 (panel C), MCF7 (panel D) y MDA-MB-453 (panel E) en una placa de 12 pozos, se cultivaron durante una noche y luego se trataron con el compuesto indicado durante 24 horas. Las células se centrifugaron y los sobrenadantes ensayaron para determinar los niveles de nucleosomas mediante ELISA. Se calculó el nivel de nucleosomas máximo porcentual (nivel de nucleosoma 4 máximo del nucleosoma alcanzado en el ensayo x 100) y se registró como una función de la concentración log del compuesto y la curva de ajuste óptimo generada usando el software IDBS, 4-Parameter LogisticModel/Dose Response/XLfit 4.2. Esta curva se usó para calcular la EC50.

La figura 10 muestra Com3 (no reivindicado), Com30 y Com188 y la hidrofobicidad o hidrofiliidad de la superficie de la molécula. Las flechas discontinuas apuntan a superficies hidrófilas, y las flechas sólidas apuntan a superficies hidrófobas.

La figura 11 ilustra el compuesto 3 (Com3, no reivindicado) de ejemplo. La imagen superior izquierda de la figura 11 muestra el Com3 (no reivindicado) acoplado a Stat3 y la interacción entre Com3 (no reivindicado) y la superficie de la proteína y derivados de Com3 (no reivindicado) que pueden encajar en la superficie de la proteína. Las estrellas

representan átomos y grupos químicos que pueden ser reemplazados por otros átomos o grupos químicos para crear uno o más derivados funcionales. Las superficies hidrófobas/hidrófilas de Com3 (no reivindicado) también se demuestran en la imagen superior derecha. Las flechas discontinuas apuntan a superficies hidrófilas, y las flechas sólidas apuntan a superficies hidrófobas. R₁ y R₂ pueden ser idénticos o diferentes y pueden comprender hidrógeno, carbono, azufre, nitrógeno, oxígeno, alcanos, alcanos cíclicos, derivados basados en alcanos, alquenos, alquenos cíclicos, derivados basados en alquenos, alquinos, derivados basados en alquinos, cetonas, derivados basados en cetonas, aldehídos, derivados basados en aldehídos, ácidos carboxílicos, derivados basados en ácidos carboxílicos, éteres, derivados basados en éteres, ésteres y derivados basados en ésteres, aminas, derivados basados en amino, amidas, derivados basados en amidas, areno monocíclico o policíclico, heteroarenos, derivados basados en areno, derivados basados en heteroarenos, fenoles, derivados basados en fenol, ácido benzoico o derivados basados en ácido benzoicos.

La figura 12 ilustra el compuesto 30 (Com30) de ejemplo. La imagen superior izquierda de la figura 12 muestra Com30 acoplado a Stat3 y la interacción entre Com30 y la superficie de la proteína, y derivados de Com30 que encajan en la superficie de la proteína. Las estrellas representan átomos y grupos químicos que pueden ser reemplazados por otros átomos o grupos químicos para crear uno o más derivados funcionales. Las superficies hidrófobas/hidrófilas de Com30 también se demuestran en la imagen superior derecha. Las flechas discontinuas apuntan a superficies hidrófilas, y las flechas sólidas apuntan a superficies hidrófobas. La estructura 2-D de Com30 mostrada en la imagen inferior, R₁, R₂, R₃ y R₄ podría ser idéntica o diferente y puede comprender hidrógeno, carbono, azufre, nitrógeno, oxígeno, alcanos, alcanos cíclicos, derivados basados en alcanos, alquenos, alquenos cíclicos, derivados basados en alquenos, alquinos, derivados basados en alquinos, cetonas, derivados basados en cetonas, aldehídos, derivados basados en aldehídos, ácidos carboxílicos, derivados basados en ácidos carboxílicos, éteres, derivados basados en éteres, ésteres y derivados basados en ésteres, aminas, derivados basados en aminas, amidas, derivados basados en amidas, areno monocíclico o policíclico, heteroarenos, derivados basados en arenos, derivados basados en heteroarenos, fenoles, derivados basados en fenoles, ácido benzoico, o derivados basados en ácido benzoicos.

La figura 13 ilustra el compuesto 188 de ejemplo (Com188). La imagen superior de la figura 13 muestra Com188 acoplado al dominio SH2 de Stat3 y la interacción entre Com188 y la superficie de la proteína, y derivados de Com188 que encajan en la superficie de la proteína. Las estrellas representan átomos y grupos químicos que pueden ser reemplazados por otros átomos o grupos químicos para crear uno o más derivados funcionales. Las superficies hidrófobas/hidrófilas de Com188 también se demuestran en la imagen izquierda en la parte inferior. Las flechas discontinuas apuntan a superficies hidrófilas, y las flechas sólidas apuntan a superficies hidrófobas. Se muestra en la imagen inferior derecha, R₁ y R₂ podrían ser idénticos o diferentes y pueden comprender hidrógeno, carbono, azufre, nitrógeno, oxígeno, alcanos, alcanos cíclicos, derivados basados en alcanos, alquenos, alquenos cíclicos, derivados basados en alquenos, alquinos, derivados basados en alquinos, cetonas, derivados basados en cetonas, aldehídos, derivados basados en aldehídos, ácidos carboxílicos, derivados basados en ácidos carboxílicos, éteres, derivados basados en éteres, ésteres y derivados basados en ésteres, aminas, derivados basados en aminas, amidas, derivados basados en amidas, areno monocíclico o policíclico, heteroarenos, derivados basados en arenos, derivados basados en heteroarenos, fenoles, derivados basados en fenoles, ácido benzoico, o derivados basados en ácido benzoicos.

La figura 14 ilustra diagramas esquemáticos de Stat1 y Stat3.

La figura 15 demuestra que la IC₅₀ de SPR de las sondas químicas de Stat3 de 2ª generación está correlacionada inversamente con la puntuación del farmacóforo 3-D.

La figura 16 muestra la IC₅₀ de SPR y la EC₅₀ de apoptosis de AML del Com188 original y dos sondas químicas de Stat3 de tipo 188 de 2ª generación.

La figura 17 proporciona una ilustración de las relaciones estructura-actividad de 38 sondas de Stat3 de tipo Com188 similares de 2ª generación. No se reivindican los compuestos 188-10, 188-11, 188-24 y 188-27.

La figura 18 muestra un esquema de modificación de ejemplo para el desarrollo de la sonda de Stat3 de 3ª generación usando Com188-15 como un andamio.

La figura 19 proporciona una ilustración de la superficie electrostática del dominio SH2 de Stat3 (zona positiva en azul, neutro en blanco y negativa en rojo en una figura de color) y 20 poses de acoplamiento de 5 (R = CH₂PO₃²⁻), mostrando fuertes interacciones entre grupos fosfonato (en púrpura y rojo) y K591/R609.

La figura 20 muestra un esquema de ejemplo de ensayo de las sondas de Stat3 candidatas en el ensayo CFU-GM normal.

La figura 21 proporciona una ilustración de construcciones de pMSCV-neo/puro de ejemplo.

La figura 22 proporciona un esquema de ejemplo de ensayo de sondas de Stat3 en el ensayo de RTTA.

La figura 23 muestra resultados de ensayo de RTTA usando proteínas de fusión representativas.

La figura 24 demuestra que Com188-9 no afectó la formación normal de colonias de CFUGM.

5 La figura 25 muestra un efecto de Com188-9 sobre CFU-GM leucémico inducido por pMSCV-neo/R1ARAR α - Δ RIL. Se proporcionan fotografías de placas representativas (panel superior) y el número total de colonias dentro de placas (panel inferior).

La figura 26 ilustra un experimento de xenoinjerto triple negativo, piloto de dos días (n = 3) con vehículo control o inhibidores de Stat3: Com188), GQ-ODN T40214 y ODN no específico (NS) a dos dosis (125 y 250 μ g). Los ratones se sacrificaron después de dos días y se midió MSFE.

10 Descripción detallada de la invención

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debe entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se dan solamente a modo de ilustración.

15 Los inhibidores de Stat3 se describen en este documento, tanto por su estructura, y por el método de desarrollo. Al menos algunos de estos se desarrollaron a partir de una criba de 920,000 compuestos similares a fármacos pequeños contra el bolsillo de unión al péptido de fosfotirosina (pY) del dominio SH2 de Stat3. El bolsillo de unión consiste en el sitio de unión del residuo pY, el sitio de unión del residuo +3 y un sitio de unión hidrófobo, que sirvió como filtro de selectividad. Tres compuestos satisfacían originalmente los criterios del análisis de acoplamiento inhibiendo Stat3 recombinate e inhibiendo la fosforilación de tirosina mediada por IL-6 de Stat3. Se identificaron otros tres compuestos
20 inhibidores de Stat3 a partir de una criba de similitud de 2.47 millones de compuestos. Además, se encontró que cinco de los seis compuestos no eran inhibidores de Stat1. El sitio de unión hidrófobo dentro de Stat3 se reveló como la base para la selectividad entre Stat3 y Stat1. Todos los cinco compuestos que fueron selectivos de Stat3 sobre Stat1 también inhibieron la translocación de núcleo a citoplasma de Stat3, mientras que 3 de los cinco indujeron la apoptosis de líneas celulares de cáncer de mama con la activación constitutiva de Stat3. Los números GeneID, que corresponden a la base de datos del National Center for Biotechnology Information, proporcionados de la siguiente manera, identifican el Stat1 humano como el GeneID 6772 y el GeneID de Stat3 como 6774.
25

30 En una realización específica de la invención, la célula a la que se administra el inhibidor de Stat3 está in vivo en un ser humano. En otra realización específica se sabe que el ser humano tiene cáncer, se sospecha que tiene cáncer, o está en riesgo de desarrollar cáncer. En otra realización, se sabe que el ser humano tiene cáncer y está recibiendo una terapia adicional. En una realización específica, la terapia contra el cáncer es quimioterapia, cirugía, radiación, o una combinación de los mismos. En realizaciones alternativas, se sabe que el mamífero tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer o una enfermedad hiperproliferativa.

Definiciones

35 Como se usa en este documento, la especificación "un" o "una" puede significar uno o más. Como se usa en este documento en la reivindicación o reivindicaciones, cuando se usa junto con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "una" pueden significar uno o más de uno. Como se usa en este documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más. Además, los términos "teniendo", "incluyendo", "conteniendo" y "comprendiendo" son intercambiables y un experto en el arte es consciente de que estos términos son términos abiertos. Algunas realizaciones de la invención pueden consistir en o consisten esencialmente en uno o más elementos, etapas de método y/o métodos de la invención.
40 Se contempla que cualquier método o composición descrito en este documento se pueda implementar con respecto a cualquier otro método o composición descritos en este documento.

El término inhibidor, como se usa en este documento, se refiere a una o más moléculas que interfieren al menos en parte con la actividad de Stat3 para llevar a cabo una o más actividades, incluyendo la capacidad de Stat3 de unirse a una molécula y/o la capacidad para ser fosforilados.

45 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en este documento significa la cantidad de un compuesto, material o composición que comprende un compuesto de la presente invención que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, tratar (esto es, prevenir y/o mejorar) el cáncer en un sujeto, o inhibir las interacciones proteína-proteína mediadas por un dominio SH2 en un sujeto, con una proporción beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para reducir o
50 eliminar al menos un síntoma. Un experto en el arte reconoce que una cantidad se puede considerar terapéuticamente eficaz incluso si el cáncer no está totalmente erradicado pero mejorado parcialmente. Por ejemplo, se puede detener o

reducir la propagación del cáncer, se puede reducir parcialmente o eliminar completamente un efecto secundario del cáncer, se puede aumentar el tiempo de vida del sujeto, el sujeto puede experimentar menos dolor, y así sucesivamente.

5 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en este documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que están, dentro del alcance de un criterio médico acertado, apropiados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

10 La expresión "en riesgo de tener cáncer" se usa en este documento para referirse a pacientes que tienen la oportunidad de tener cáncer debido a factores pasados, presentes o futuros. Estos factores pueden incluir, pero no se limitan a: historia del paciente, historia familiar, identificación de marcadores de cáncer genérico o específico de tejido, tales como BRACA-1 o CEA, edad, raza, dieta, fumador o ciertas exposiciones tales como la exposición a sustancias químicas o a la radiación.

15 Como se usa en este documento, "afinidad de unión" se refiere a la intensidad de una interacción entre dos entidades, tal como una interacción proteína-proteína. La afinidad de unión se denomina a veces K_a , o constante de asociación, que describe la probabilidad de que las dos entidades separadas estén en el estado unido. Generalmente, la constante de asociación se determina mediante una variedad de métodos en los que se mezclan dos entidades separadas, la parte no unida se separa de la parte unida y se miden las concentraciones de no unidas y unidas. El experto en el arte se da cuenta de que hay una variedad de métodos de medición de constantes de asociación. Por ejemplo, las partes unidas y no unidas se pueden separar entre sí a través de adsorción, precipitación, filtración en gel, diálisis o centrifugación, por ejemplo. La medición de las concentraciones de partes unidas y no unidas se puede realizar, por ejemplo, midiendo la radiactividad o la fluorescencia, por ejemplo. En ciertas realizaciones de la invención, la afinidad de unión de un inhibidor de Stat3 para el dominio SH2 de Stat3 es similar o mayor que la afinidad de los compuestos enumerados en este documento.

25 El término "cáncer resistente a la quimioterapia" como se usa en este documento se refiere a un cáncer que se sospecha que no puede ser tratado con una o más quimioterapias particulares o que se sabe que es incapaz de ser tratado con una o más quimioterapias particulares. En particular, las células del cáncer resistente a la quimioterapia no se matan o se hacen inactivas con la terapia o incluso continúan multiplicándose durante o poco después de la terapia. El cáncer puede ser al principio sensible a un tratamiento y luego desarrollar resistencia a lo largo del tiempo, por ejemplo, en algunas realizaciones.

30 El término "dominio" como se usa en este documento se refiere a una subsección de un polipéptido que posee una característica estructural y/o funcional única; por lo general, esta característica es similar a través de diversos polipéptidos. La subsección comprende por lo general aminoácidos contiguos, aunque también puede comprender aminoácidos que actúan de forma concertada o que están en estrecha proximidad debido a plegado u otras configuraciones. Un ejemplo de un dominio proteico es el dominio de homología 2 a Src (SH2) de Stat3. El término "dominio SH2" está reconocido en la técnica y, como se usa en este documento, se refiere a un dominio proteico implicado en interacciones proteína-proteína, tal como un dominio dentro de la tirosina quinasa Src que regula la actividad quinasa. La invención contempla la modulación de la actividad, tal como la actividad dependiente de las interacciones proteína-proteína, mediada por dominios SH2 de proteínas (por ejemplo, tirosina quinasas tales como Src) o proteínas implicadas en la transmisión de una señal de tirosina quinasa en organismos incluyendo mamíferos, tales como seres humanos. La secuencia de aminoácidos del dominio SH2 de Stat3 es:

MVNREVLQDQVERGYRMPCPPECPESLHDLMCQCWRKEPEERPTFEYLQAFLEDYFTST EPQYQPGENL (SEQ ID NO:1).

45 Como se usa en este documento, un "mamífero" puede ser cualquier miembro de la clase de vertebrados superiores Mammalia, incluyendo seres humanos; caracterizado por el nacimiento vivo, el pelo del cuerpo, y las glándulas mamarias en la hembra que secretan la leche para alimentar a los jóvenes. Además, los mamíferos se caracterizan por su capacidad para mantener una temperatura corporal constante a pesar de las cambiantes condiciones climáticas. Ejemplos de mamíferos son humanos, gatos, perros, vacas, ratones, ratas, y chimpancés. Los mamíferos se pueden denominar como "pacientes" o "sujetos" o "individuos".

50 El lenguaje "que modula una actividad mediada por un dominio SH2", como se usa en este documento, se refiere a la inhibición, supresión o aumento de la actividad de una vía de señalización celular mediada por una proteína que incluye un dominio SH2, por ejemplo, interrumpiendo interacciones proteína-proteína mediadas por dominios SH2. En una realización preferida, se inhibe una actividad mediada por un dominio SH2, por ejemplo, se inhibe una interacción de Stat3 y EGFR. En otra realización preferida, se inhibe una interacción de Stat3 y G-CSFR. En otra realización preferida, una interacción de una molécula de Stat3 con otra molécula de Stat3 para formar un homodímero.

I. Derivados

El término “derivado” como se usa en este documento, es un compuesto que se forma a partir de un compuesto similar o un compuesto que se puede considerar que surge de otro compuesto, si un átomo se sustituye por otro átomo o grupo de átomos. El derivado también se puede referir a compuestos que al menos teóricamente se pueden formar a partir del compuesto precursor.

El término “derivado funcionalmente activo” o “derivado funcional” es un derivado como se definió previamente que retiene la función del compuesto del que se deriva.

Las composiciones de la presente invención y cualquiera de los derivados funcionalmente activos de los mismos se pueden obtener por cualquier medio apropiado. En casos específicos, los derivados se proporcionan comercialmente, aunque en casos alternos los derivados se sintetizan. La síntesis química de los derivados puede emplear técnicas bien conocidas a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. Tales transformaciones sintéticas pueden incluir, pero no se limitan a, protección, desprotección, oxidación, reducción, acoplamiento cruzado C-C catalizado por metal, acoplamiento de Heck o etapas de acoplamiento de Suzuki (véase, por ejemplo, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structures*, 5th Edition John Wiley and Sons by Michael B. Smith and Jerry March).

II. Direccionamiento de Stat3

Las proteínas STAT, de las cuales hay siete (1, 2, 3, 4, 5A, 5B y 6), transmiten señales de hormona peptídica desde la superficie celular hasta el núcleo. La información estructural detallada de las proteínas STAT actualmente está limitada a Stat1 y Stat3. Stat1 (figura 14) fue la primera STAT que se descubrió (Fu et al., 1992) y es requerido para la señalización por los IFN de Tipo I y II (Meraz et al., 1996; Wiederkehr-Adam et al., 2003; Durbin et al., 1996; Haan et al., 1999). Los estudios en ratones con deficiencia de Stat1 (Meraz et al., 1996; Durbin et al., 1996; Ryan et al., 1998) apoyan un papel esencial para Stat1 en la inmunidad innata, especialmente contra patógenos virales. Además, Stat1 es un potente inhibidor del crecimiento y promotor de la apoptosis (Bromberg and Darnell, 2000). Además, debido a que los tumores de animales de tipo salvaje tratados con carcinógenos crecen más rápidamente cuando se trasplantan a los animales deficientes en Stat1 que en un huésped de tipo salvaje, Stat1 contribuye a la vigilancia de tumores (Kaplan et al., 1998).

Stat3 se denominó originalmente factor de respuesta de fase aguda (APRF) porque se identificó por primera vez como un factor de transcripción que se unía a elementos de respuesta a IL-6 dentro de la región promotora de potenciador de diversos genes de proteínas de fase aguda (Akira, 1997). Además de los receptores para la familia de citoquinas IL-6, otras vías de señalización están unidas a la activación de Stat3 incluyen receptores para otros receptores de citoquinas de tipo I y tipo II, tirosina quinasas receptoras, receptores acoplados a proteína G y quinasas Src (Schindler and Darnell, 1995; Turkson et al., 1998). La disrupción dirigida del gen de Stat3 del ratón conduce a la letalidad embrionaria entre 6.5 y 7.5 días (Takeda et al., 1997), indicando que Stat3 es esencial para el desarrollo embrionario temprano, posiblemente gastrulación o función del endodermo visceral (Akira, 2000). La delección específica de tejidos de Stat3 usando la tecnología Cre-lox ha revelado una disminución de la apoptosis de las células epiteliales mamarias que tiene como resultado una involución tardía de la mama durante el destete (Chapman et al., 1999). Hallazgos recientes indican que el cambio de la proteína STAT predominante activada por un receptor dado puede ocurrir cuando una STAT en dirección 3' de ese receptor es genéticamente suprimido (Costa-Pereira et al., 2002; Qing and Stark, 2004). Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que el efecto de la delección de Stat3 en el tejido mamario pueda estar mediado indirectamente por el aumento de la activación de otras proteínas STAT, especialmente Stat5.

Isoformas Stat1 y Stat3. Se han identificado dos isoformas de Stat1 y Stat3-- α (p91 y p92, respectivamente) y β (p84 y p83, respectivamente) (Schindler et al., 1992; Schaefer et al., 1995; Caldenhoven et al., 1996; Chakraborty et al., 1996)-- que surgen debido al empalme alternativo de ARNm (figura 14). En contraste con Stat1 β (712 aa), en el que la transactivación C-terminal es simplemente suprimida, los 55 residuos de aminoácidos de Stat3 α se sustituyen en Stat3 β por 7 residuos de aminoácidos únicos en su extremo C. A diferencia de Stat1 β , Stat3 β no es simplemente un dominante negativo de Stat3 α (Maritano et al., 2004) y regula los objetivos de genes de una manera distinta de Stat3 β (Maritano et al., 2004; Yoo et al., 2002). Se ha demostrado que Stat3 α contribuye a la transformación en los modelos celulares y muchos cánceres humanos, incluyendo el cáncer de mama. Se demostró que Stat3 α se activaba constitutivamente en fibroblastos transformados por oncoproteínas tales como v-Src (Yu et al., 1995; Garcia and Jove, 1998) y que era esencial para la transformación mediada por v-Src (Turkson et al., 1998, Costa-Pereira et al., 2002). En contraste con Stat3 α , la transformación de v-Src antagonizada por Stat3 β mediada por Stat3 α (Turkson et al., 1998). La sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de Stat3 α en fibroblastos inmortalizados de rata o ratón indujo su transformación y confería la capacidad de formar tumores en ratones desnudos (Bromberg et al., 1999). Stat3 ha demostrado ser activado constitutivamente en una variedad de tumores hematológicos y sólidos, incluyendo el cáncer de mama (Dong et al., 2003, Redell and Twardy, 2003) como resultado de ya sea la producción de factor de

crecimiento autocrino o la desregulación de las proteínas tirosina quinasas. En prácticamente todos los casos, la isoforma que demuestra una mayor actividad es Stat3 α .

5 Direccionamiento de Stat3 α mientras se preserva Stat1. Debido a sus múltiples papeles contribuyentes a la oncogénesis, Stat3 ha ganado recientemente atención como una diana potencial para la terapia contra el cáncer (Bromberg, 2002; Turkson, 2004). Aunque varios métodos de inhibición de Stat3 se han empleado con éxito y han establecido la prueba de principio de que el direccionamiento de Stat3 es potencialmente beneficioso en una variedad de sistemas tumorales incluyendo cáncer de mama en el que Stat3 es constitutivamente activado (Epling-Burnette et al., 2001; Yoshikawa et al., 2001; Li and Shaw, 2002; Catlett-Falcone et al., 1999; Mora et al., 2002; Grandis et al., 2000; Leong et al., 2003; Jing et al., 2003; Jing et al., 2004; Turkson et al., 2001; Ren et al., 2003; Shao et al., 2003; Turkson et al., 2004; Uddin et al., 2005); todos tienen limitaciones potenciales para la traducción al uso clínico para la terapia contra el cáncer relacionada con los problemas relacionados con la entrega, la especificidad o la toxicidad.

15 Se han seguido estrategias específicas que se dirigen a Stat3 mediante la identificación de inhibidores de reclutamiento y/o dimerización de Stat3 por varios grupos (Turkson et al., 2001; Ren et al., 2003; Shao et al., 2003; Uddin et al., 2005; Song et al., 2005; Schust et al., 2006). Como se describe a continuación, esta estrategia tiene el potencial de conseguir especificidad basándose en la observación de que el motivo del péptido pY preferido de cada proteína STAT es distinto. Cuando se combina con un enfoque de moléculas pequeñas, esta estrategia tiene el potencial de superar los problemas de suministro y toxicidad.

20 Direccionamiento de Stat3 α mientras se preserva Stat3 β . Algunas de las características bioquímicas distintas de Stat3 β frente a Stat3 α , en particular la activación constitutiva y una afinidad de unión de ADN aumentada de 10 a 20 veces, se han atribuido a la ausencia del dominio de transactivación C-terminal (TAD) que da como resultado una mayor estabilidad del dímero Stat3 β (Park et al., 1996; Park et al., 2000). El aumento de la estabilidad de los dímeros probablemente resulte de una mayor afinidad de unión del dominio SH2 a los motivos del péptido pY cuando en el contexto de Stat3 β comparado con Stat3 α , debido a la reducción de la barrera estérica conferida por la eliminación del TAD. Estas características bioquímicas diferenciales entre Stat3 α y Stat3 β se explotan para desarrollar un compuesto químico que selectivamente se orienta a Stat3 α , en algunos casos. Esta selectividad aumenta el efecto antitumoral de tales compuestos, en ciertos casos, porque preservarían Stat3 β , que funciona para antagonizar las funciones oncogénicas de Stat3 α .

30 En ciertos casos, terapias específicas orientadas a la señalización Stat3 en la única subpoblación quimiorresistente de células cancerosas mejoran la eficacia de los tratamientos actuales. Como se describe en los ejemplos a continuación, los inventores han identificado inhibidores competitivos y selectivos de moléculas pequeñas de plomo de Stat3 que dirigen las interacciones de péptido pY-SH2 de Stat3 usando un enfoque de cribado virtual de ligandos basado en un modelo estructural de esta interacción desarrollado por los inventores. El más activo de estos compuestos de plomo se utilizó en el análisis 3-D del farmacóforo para identificar compuestos de 2^a generación. En estudios iniciales, algunos tienen una actividad 1-2 log mayor que el compuesto principal de plomo. En este documento, los inventores emplean un enfoque basado en la relación estructura-actividad (SAR) para desarrollar nuevos inhibidores de Stat3 de 3^a generación. En última instancia, estos estudios llevan al desarrollo de nuevos inhibidores de Stat3 de moléculas pequeñas para suprimir las vías de autorrenovación de células madre cancerosas para mejorar las terapias existentes contra el cáncer de mama en pacientes, por ejemplo.

III. Direccionamiento de células madre cancerosas

40 La capacidad de probar químicamente tanto las células madre normales como las cancerosas es esencial para comprender y controlar su función, especialmente para tratar a pacientes con una deficiencia en el número o función de células maduras, o para curar pacientes con cáncer. En particular, curar el cáncer requerirá el desarrollo de fármacos que se dirigen a las células madre cancerosas mientras se preservan las células madre normales. El entendimiento de las señales necesarias para el mantenimiento y la expansión de las células madre normales y cancerosas es incompleta y está limitada por la escasez de sondas para el direccionamiento específico de células madre.

50 Se han acumulado pruebas recientes de que Stat3 se requiere para el mantenimiento de algunas células madre normales (células madre embrionarias) pero no otras (células madre hematopoyéticas normales), por ejemplo. Por el contrario, la evidencia se está acumulando para un papel crítico para Stat3 en la supervivencia de las células madre en múltiples sistemas de cáncer incluyendo la leucemia mieloide aguda (AML) y el cáncer de mama. El desarrollo de sondas altamente eficaces que se dirigen a Stat3 es útil para la comprensión de células madre normales y cancerosas y es útil para el tratamiento contra el cáncer a través del direccionamiento de células madre cancerosas y la preservación de células madre hematopoyéticas normales.

55 En casos específicos, los inhibidores de Stat3 específicos se dirigen selectivamente a células madre cancerosas. En ciertos casos, los inhibidores de Stat3 preservan las células madre hematopoyéticas normales mientras que se dirigen a las células madre leucémicas, así como otras células madre cancerosas, como las células madre cancerosas de mama.

Para comenzar a desarrollar sondas químicas que selectivamente se dirigen a Stat3, los inventores cribaron virtualmente 920,000 pequeños compuestos similares a fármacos acoplado cada uno en el bolsillo de unión del péptido del dominio SH2 de Stat3, que consiste en tres sitios: -el sitio de unión del residuo pY, el sitio de unión del residuo +3 y un sitio de unión hidrófobo, que sirvió como filtro de selectividad (Alten, 2006). Tres compuestos (Com3 (no reivindicado), Com30 y Com188) satisfacen criterios de análisis de interacción, inhiben competitivamente la unión de Stat3 recombinante a su ligando del péptido pY inmovilizado e inhiben la fosforilación de tirosina mediada por IL-6 de Stat3. Estos compuestos se usaron en una criba de similitud de 2.47 millones de compuestos, los cuales identificaron 3 compuestos más (Com3-2 (no reivindicado), Com3-7 (no reivindicado) y Com30-12) con actividades similares.

Los exámenes de los 6 compuestos activos para determinar la capacidad para inhibir la fosforilación de Stat1 mediada por IFN- γ revelaron que todos menos Com30-12 eran selectivos para Stat3. Todas las 5 sondas selectivas Stat3 inhibieron la translocación de núcleo a citoplasma de Stat3, mientras que 3 de 5 sondas (Com3 (no reivindicado), Com30 y Com188) indujeron apoptosis preferencialmente de células cancerosas con activación constitutiva de Stat3.

El cribado de similitud inicial no produjo ningún éxito usando la más activa de las 3 sondas de plomo, Com188, como el compuesto de consulta. Por consiguiente, los inventores repitieron el cribado de similitud 2-D usando el andamio de Com188 como estructura de consulta y la biblioteca de Life Chemicals, que produjo 207 éxitos. Se realizó el análisis de farmacóforo 3-D y se compraron los 39 compuestos de puntuación superiores y se ensayó para determinar la inhibición de la unión de Stat3 a su ligando fosfopeptídico por resonancia del plasmón de la superficie (SPR). Todos excepto seis de estos 39 compuestos tienen IC₅₀ medibles, siendo 19 con valores IC₅₀ iguales o menores que la sonda original; dos sondas (Com188-9 y Com188-15) tienen valores de IC₅₀ en SPR y en ensayos de apoptosis de células de leucemia que son un log mejor que el Com188 original. En aspectos particulares de la invención, Stat3 es dispensable para la función de células madre hematopoyéticas normales, pero no para células madre cancerosas, por ejemplo, células madre leucémicas.

La presente invención se refiere a lo siguiente: 1) uso de la química medicinal en la síntesis de sondas de Stat3 de sulfamida tipo 188 de 3^a generación (la sonda de 2^a generación más activa, Com188-15, sirve como un andamio para hacer sondas de 3^a generación y en ciertos casos hay modificaciones según el análisis de relación estructura-actividad (SAR) realizado en sondas de 2^a generación que se centran en la síntesis directa de sulfamidas a partir de paneles de cloruros y amidas de sulfonilo); 2) identificación de sondas químicas entre los compuestos de sulfamida sintetizados en el punto 1) que son los más activos y selectivos para Stat3; cada nuevo compuesto de sulfamida se examina en un ensayo SPR de rendimiento rápido para determinar la capacidad para inhibir la unión de Stat3 a su ligando fosfopeptídico seguido por un ensayo de microscopía de fluorescencia de alto rendimiento (HTFM) que examina la inhibición de la translocación del citoplasma al núcleo estimulada por IL-6; las sondas más activas en estos ensayos se examinan en cuanto a su selectividad para Stat3 frente a Stat1 mediante la prueba de inhibición de la fosforilación de Stat3 estimulada con IL-6 y por fracaso para inhibir la fosforilación de Stat1 estimulada con IFN- γ ; y 3) examen de sondas químicas de Stat3 de 3^a generación candidatas para determinar la capacidad de dirigir selectivamente células madre leucémicas mieloides mientras se preservan las células progenitoras/madre hematopoyéticas normales, en las que los compuestos que demuestran actividad mayor que la sonda de tipo 188 de 2^a generación más activa y la selectividad para Stat3 se examinan para evaluar la capacidad de dirigir las células madre leucémicas mientras se preservan las células madre hematopoyéticas normales.

IV. Terapia de combinación

Un aspecto de esta invención es que un inhibidor de Stat3 de la invención se usa en combinación con otro agente o método de terapia, tal como otro tratamiento para el cáncer. El inhibidor de Stat3 puede preceder o seguir al otro tratamiento del agente mediante intervalos que van desde minutos a semanas, por ejemplo. En los casos en que el otro agente y la composición se aplican por separado a una célula cancerosa, tal como cuando se entrega a un individuo sospechoso de tener cáncer, que se sabe que tiene cáncer o que está en riesgo de tener cáncer, se aseguraría generalmente que un período significativo de tiempo no expiró entre el momento de cada entrega, de tal manera que el agente y la composición de la invención todavía pudieran ejercer un efecto ventajosamente combinado sobre la célula. Por ejemplo, en tales casos, se contempla que uno puede contactar la célula, tejido u organismo con una, dos, tres, cuatro o más modalidades de forma sustancial simultáneamente (esto es, dentro de menos de aproximadamente un minuto) con el inhibidor de Stat3 de la invención. En otros aspectos, se pueden administrar uno o más agentes en aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 25 horas, aproximadamente 26 horas, aproximadamente 27 horas, aproximadamente 28 horas, aproximadamente 29 horas, aproximadamente 30 horas,

aproximadamente 31 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 33 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 37 horas, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 39 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 41 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 43 horas, aproximadamente 44 horas, aproximadamente 45 horas, aproximadamente 46 horas, aproximadamente 47 horas, a aproximadamente 48 horas o más antes y/o después de administrar el inhibidor de Stat3 de la invención. En algunos otros casos, se puede administrar un agente dentro de aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 17 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 19 días, aproximadamente 20, a aproximadamente 21 días antes y/o después de administrar el inhibidor de Stat3 de la invención, por ejemplo. En algunas situaciones, puede ser deseable prolongar el período de tiempo del tratamiento significativamente, tal como cuando varias semanas (por ejemplo, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7 o aproximadamente 8 semanas o más) transcurren entre las respectivas administraciones.

Se pueden emplear diversas combinaciones, el inhibidor de Stat3 de la invención es "A" y el agente secundario, que puede ser cualquier otro agente terapéutico para el cáncer, es "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

La administración de las construcciones de expresión terapéutica de la presente invención a un paciente seguirá protocolos generales para la administración de quimioterapéuticos, teniendo en cuenta la toxicidad. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que pueden aplicarse diversas terapias estándar, así como una intervención quirúrgica, en combinación con el inhibidor de Stat3 de la invención. Las terapias adicionales incluyen, pero no se limitan a quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, terapia génica y cirugía, por ejemplo.

A. Quimioterapia

Las terapias contra el cáncer también incluyen una variedad de terapias de combinación con tratamientos tanto químicos como basados en radiación. En casos específicos, la terapia adicional para la terapia de la invención también se orienta a células madre cancerosas. La quimioterapia de combinación incluye, por ejemplo, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfano, nitrosurea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión del receptor de estrógeno, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de proteína farnesil transferasa, inhibidores COX-2, inhibidores de la síntesis de colesterol, cisplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina, estaurosporina, estreptozocina, fludurabina, metotrexato, genisteína, curcumina, resveratrol, silimarina, fenetil éster del ácido cafeico, flavopiridol, emodina, polifenoles del té verde, piperina, oleandrina, ácido ursólico, ácido glutámico, actinomicina D, talidomida o cualquier análogo o variante derivado de los anteriores. La quimioterapia puede ser sistémica, dirigida y/o basada en hormonas. Estos se pueden usar individualmente o en combinación. Una terapia de ejemplo de cáncer de mama incluye herceptina, tykerb, arastina, tamoxifeno e inhibidores aromáticos. Otros tratamientos de ejemplo son oxaliplatino, docetaxel, imatinib y abraxan, además de inhibidores de tirosina quinasa tales como sunitinib o sunitinib. Un experto en el arte sabría que los tipos de ARNip del tratamiento contra el cáncer también pueden ser considerados.

B. Radioterapia

Otros factores que causan daño al ADN y que se han utilizado ampliamente incluyen lo que comúnmente se conocen como rayos γ , rayos X, y/o la administración dirigida de radioisótopos a células tumorales. También se contemplan otras formas de factores dañinos del ADN tales como microondas y radiación UV. Es muy probable que todos estos factores afecten a una amplia gama de daños en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y reparación del ADN, y en el montaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación para los rayos X van desde dosis diarias de 50 a 200 roentgen durante períodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), hasta dosis únicas de 2000 a 6000 roentgen. Los intervalos de dosificación de los radioisótopos varían ampliamente y dependen de la vida media del isótopo, la intensidad y el tipo de radiación emitida y la captación por las células neoplásicas. Los términos "contacto" y "expuesto", cuando se aplican a una célula, son utilizados en este documento para describir el proceso por el cual una construcción terapéutica y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico se entregan a una célula diana o son

colocados en yuxtaposición directa con la célula diana. Para conseguir la muerte celular o la estasis, ambos agentes se suministran a una célula en una cantidad combinada eficaz para matar la célula o impedir que se divida.

C. Radioquimioterapia

5 La radioquimioterapia es la administración combinada de radiación y quimioterapia a una diana. Esto se puede conseguir en un solo agente a través de la conjugación de un agente quimioterapéutico con una unidad estructural quelante, que es posteriormente radiomarcada con un radionúclido terapéutico. Las combinaciones de radioquimioterapia incluyen, por ejemplo, cisplatino (CDDP) con emisores a, ciclofosfamida con emisores b, doxorubicina con emisores b/g y taxol con emisores Auger, o cualquier análogo o derivado variante de los anteriores.

D. Inmunoterapia

10 Los inmunoterapéuticos, en general, se basan en el uso de células efectoras inmunes y moléculas para dirigir y destruir células cancerosas. El efector inmune puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como efector de terapia o puede reclutar otras células para efectivamente efectuar la muerte celular. El anticuerpo también se puede conjugar con un fármaco o toxina (quimioterapéutico, radionucleótido, cadena A de ricina, toxina del cólera, toxina de pertussis, etc.) y servir únicamente como un agente de orientación. Alternativamente, el efector puede ser un linfocito portador de una molécula superficial que interactúa, ya sea directa o indirectamente, con una diana de células tumorales. Diversas células efectoras incluyen células T citotóxicas y células NK.

20 De este modo, la inmunoterapia se podría utilizar como parte de una terapia combinada, posiblemente en combinación con terapia génica. El enfoque general para la terapia combinada se describe a continuación. Generalmente, la célula tumoral debe llevar algún marcador que sea susceptible al direccionamiento, esto es, no esté presente en la mayoría de otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser apropiado para el direccionamiento en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales comunes incluyen antígeno carcinoembrionario, antígeno de próstata específico, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno de Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, erb B y p155, por ejemplo.

E. Terapia génica

30 En otro caso más, el tratamiento secundario es una terapia génica en la que se administra un polinucleótido terapéutico antes, después o al mismo tiempo un primer agente terapéutico. La administración del agente terapéutico junto con un vector que codifica un producto génico tendrá un efecto antihiperproliferativo combinado sobre los tejidos diana, en ciertos casos.

F. Cirugía

35 Aproximadamente el 60% de las personas con cáncer se someterá a cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, diagnóstica o estadística, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento contra el cáncer que se puede usar junto con otras terapias, tales como el tratamiento de la presente invención, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas. La cirugía curativa incluye la resección en la cual todo o parte del tejido canceroso se retira físicamente o parcialmente, se extirpa y/o se destruye. La resección del tumor se refiere a la eliminación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección del tumor, el tratamiento mediante cirugía incluye cirugía con láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía microscópica controlada (cirugía de Mohs). Se contempla además que la presente invención se puede usar junto con la eliminación de cánceres superficiales, precánceres, o cantidades incidentales de tejido normal. La cirugía de cáncer de mama incluye mastectomía o lumpectomía.

V. Composiciones farmacéuticas

45 Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento comprenden una cantidad eficaz de una composición de la invención disuelta o dispersa en un portador farmacéuticamente aceptable. Las expresiones "farmacéuticas" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un inhibidor de Stat3 de la invención, y en algunos casos un ingrediente activo adicional, será conocida para los expertos en el arte a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para la administración a un animal (por ejemplo, humano), se entenderá que las preparaciones deben cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según lo requiere por FDA Office of Biological Standards.

5 Como se usa en este documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, surfactantes, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, materiales similares y combinaciones de los mismos, como serían conocidos para un experto en el arte (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Excepto en la medida en que cualquier portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

10 El inhibidor de Stat3 de la invención puede comprender diferentes tipos de portadores dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o en aerosol, y si necesita ser estéril para tales rutas de administración tales como inyección. La presente invención se puede administrar por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarectal, tópica, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, a través de la mucosa, por vía intrapericardial, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inyección, infusión, infusión continua, baño de perfusión localizado directamente de células diana, a través de un catéter, mediante un lavado, en composiciones lipídicas (por ejemplo liposomas), o por otro método o cualquier combinación de lo anterior como sería conocido para un experto en el arte (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990).

20 La cantidad de dosificación real de una composición de la presente invención administrada a un paciente se puede determinar por factores físicos y fisiológicos tales como el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, las intervenciones terapéuticas anteriores o concurrentes y la ruta de administración. En cualquier caso, el médico responsable de la administración determinará la concentración de ingrediente(s) activo(s) en una composición y dosis apropiada(s) para cada individuo.

25 En ciertos casos, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 0.1% de un inhibidor de Stat3 de la invención. En otros casos, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente 2% a aproximadamente 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente 25% a aproximadamente 60%, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable en el mismo. En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender desde aproximadamente 0.1 mg/kg/peso corporal, 0.5 mg/kg/ peso corporal, 1 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 10 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 20 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 30 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 40 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 75 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 200 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 350 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 500 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 750 mg/kg/peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable en el mismo. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números enumerados en este documento, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 10 mg/kg/peso corporal hasta aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, etc., en base a los números descritos anteriormente. En ciertos casos, se contemplan diversos mecanismos de dosificación. Por ejemplo, la composición se puede administrar una o más veces al día, una o más veces a la semana, o una o más veces al mes, y así sucesivamente.

40 En cualquier caso, la composición puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Además, la prevención de la acción de microorganismos puede ser provocada por conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, pero no limitando a parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

45 El inhibidor de Stat3 de la invención se puede formular en una composición en forma de base libre, neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales formadas con los grupos carboxilo libres derivados de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

50 En los casos en que la composición está en forma líquida, un portador puede ser un solvente o medio de dispersión que comprende, pero no se limita a, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina; por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido por dispersión en portadores tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; mediante el uso de surfactantes tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de los mismos, tales métodos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o combinaciones de los mismos.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando la presente invención en la cantidad requerida del solvente apropiado con diversas cantidades de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado por vacío o liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de un medio líquido previamente filtrado estérilmente del mismo. El medio líquido debe ser adecuadamente regulado si es necesario y el diluyente líquido se hace primero isotónico antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. También se contempla la preparación de composiciones altamente concentradas para inyección directa, en las que se prevé el uso de DMSO como solvente para dar lugar a una penetración extremadamente rápida, proporcionando concentraciones elevadas de los agentes activos a una zona pequeña.

La composición debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento, y preservada contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxina se debe mantener mínimamente a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0.5 ng/mg de proteína.

En casos particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable puede ser provocada por el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

VI. Kits de la invención

Cualquiera de las composiciones de inhibidores de Stat3 descritas en la presente memoria puede estar comprendida en un kit, y se almacenan en un recipiente apropiado. Los kits comprenderán de este modo, en medios de envase apropiados, uno o más inhibidores de Stat3 y, en algunos casos, un agente adicional de la presente invención.

Los componentes de los kits se pueden envasar en medios acuosos o en forma liofilizada. Los medios de envase de los kits incluirán generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, frasco, botella, jeringa u otro medio de recipiente, en el que se puede colocar un componente, y preferiblemente, una alícuota de manera apropiada. Cuando hay más de un componente en el kit, el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el que los componentes adicionales se pueden colocar por separado. Sin embargo, diversas combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial. Los kits de la presente invención también incluirán por lo general un medio para contener el inhibidor de Stat3, agente adicional y cualquier otro recipiente de reactivo en estrecho confinamiento para la venta comercial. Tales recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se conservan los viales deseados.

Las composiciones también se pueden formular en una composición inyectable. En este caso, los medios de envase pueden ser ellos mismos una jeringa, una pipeta y/u otro aparato semejante, del cual la formulación se puede aplicar a una zona infectada del cuerpo, inyectar en un animal, y/o incluso aplicar a, y/o mezclar con los otros componentes del kit. Sin embargo, los componentes del kit se pueden proporcionar como polvo(s) seco(s). Cuando se proporcionan reactivos y/o componentes en forma de polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un solvente apropiado. Se prevé que el solvente también se puede proporcionar en otros medios de envase.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Se debe apreciar por los expertos en el arte que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los inventores para funcionar bien en la práctica de la invención, y de este modo se pueden considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en el arte deben, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen dentro del alcance de las reivindicaciones.

45 Ejemplo 1

Materiales y métodos de ejemplo

Cribado virtual de ligandos. Los inventores aislaron la estructura tridimensional del dominio SH2 de Stat3 de la estructura de fragmentos de núcleo de homodímeros de Stat3 fosforilados unidos a ADN (Becker et al., 1998) depositados en el banco de datos (PDB) de Protein Data Bank RCSB (código PDB 1BG1) y lo convirtió en un sistema compatible con Internal Coordinate Mechanics (ICM) mediante la adición de átomos de hidrógeno, la modificación de aminoácidos inusuales, la realización de ajustes de carga y la realización de etapas de limpieza adicionales. Además, los inventores recuperaron las coordenadas del dominio SH2 de Stat1 del banco de datos PDB (código PDB 1BF5) para

su uso en análisis de selectividad computacional (Chen et al., 1998). Se eligieron bases de datos químicas comerciales (Chembridge, Asinex, ChemDiv, Enamine, Keyorganics and Life Chemicals) como fuentes de compuestos para el cribado in silico. La selección fue del hidrógeno de amida de E638 dentro del sitio que se une al residuo +3 (Q, C o T) dentro del ligando del péptido pY (Shao et al., 2006) como el punto central del bolsillo de unión, que consistía en un cubo con dimensiones 16.0 x 16.9 x 13.7 angstrom. Además del sitio de unión +3, este cubo contenía el sitio de unión del residuo pY consistente principalmente en R609 y K591 (Shao et al., 2006) y un sitio de unión hidrófobo que consistía en Bucle_{βC-βD} y Bucle_{αB-αC}. La alineación de secuencias y la superposición de las estructuras Stat3 y Stat1 revelaron diferencias sustanciales en la secuencia de estos bucles; la falta de su superposición indicó que esta región podría servir como un filtro de selectividad (Cohen et al., 2005). Se realizó un cálculo de acoplamiento flexible (Totrov and Abagyan 1997) con el fin de determinar la puntuación de energía mínima global y predecir así la conformación óptima del compuesto dentro del bolsillo. Se seleccionó un compuesto para la compra y se realizaron pruebas bioquímicas basadas en el cumplimiento de los criterios de análisis de interacción (CIA): 1) puntuación de energía mínima total ≤ -30 , 2) formación de una red de puente salino y/o enlace de H en el sitio de unión del residuo pY y 3) formación de un enlace de H con o bloqueando el acceso al hidrógeno de amida de E638. La mayoría de los compuestos, pero no todos, interactuaron también con el sitio de unión hidrófobo.

Ensayo de unión de SH2 de Stat3/péptido pY. Los ensayos de unión a Stat3 se realizaron a 25°C con un biosensor BIAcore 3000 usando solución reguladora Tris 20 mM pH 8 que contenía mercaptoetanol 2 mM y DMSO al 5% como solución reguladora de análisis (Kim et al., 2005). Se inmovilizaron dodecapéptidos derivados de EGFR biotinilados fosforilados y control no fosforilados basados en la secuencia que rodea a Y1068 (Shao et al., 2004) en un chip sensor recubierto con estreptavidina (BIAcore inc., Picataway NJ). La unión de Stat3 se llevó a cabo en solución reguladora Tris 20 mM pH 8 que contenía β -mercaptoetanol 2 mM a una velocidad de flujo de 10 μ L/min durante 1-2 minutos. Alícuotas de Stat3 a 500 nM se mezclaron previamente con el compuesto para alcanzar una concentración final de 1-1,000 μ M y se incubaron a 4°C antes de ser inyectadas sobre el chip sensor. El chip se regeneró inyectando 10 μ L de glicina 100 mM a pH 1.5 después de cada inyección de muestra. Se realizó un control (Stat3 con DMSO, pero sin compuesto) al principio y al final de cada ciclo (40 inyecciones de muestra) para asegurar que la integridad del chip del sensor se mantuvo a lo largo del análisis del ciclo. El promedio de los dos controles se normalizó al 100% y se usó para evaluar el efecto de cada compuesto sobre la unión de Stat3. Las respuestas se normalizaron dividiendo el valor a 2 min por la respuesta obtenida en ausencia de compuestos a 2 min y multiplicando por 100. Los valores de IC₅₀ se determinaron realizando un gráfico del % de respuesta máxima en función de la concentración log del compuesto y ajustando los puntos experimentales a un modelo de unión competitiva usando una ecuación logística de cuatro parámetros: $R = R_{\text{alto}} - (R_{\text{alto}} - R_{\text{bajo}}) / (1 + \text{conc}/A1)^{A2}$, donde R = porcentaje de respuesta a la concentración del inhibidor, R_{alto} = porcentaje de respuesta sin compuesto, R_{bajo} = porcentaje de respuesta a la concentración de compuesto más alta, A2 = parámetro de ajuste (pendiente) y A1 = IC₅₀ (BIAevaluation Software versión 4.1).

Ensayo de inmunotransferencia. La línea celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) se cultivó en placas de 6 pozos bajo condiciones estándar. Las células se trataron previamente con los compuestos (0, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 μ M) durante 1 hora y luego se estimularon en condiciones óptimas con interferón gamma (IFN- γ ; 30 ng/ml durante 30 minutos) para activar Stat1 o interleucina-6 (IL-6; 30 ng/ml durante 30 minutos) para activar Stat3 (30-31). A continuación, se recolectaron los cultivos y se extrajeron las proteínas usando una solución reguladora con alto contenido de sal, como se describe (Shao et al., 2006). En resumen, los extractos se mezclaron con solución reguladora de muestra de dodecilsulfato de sodio 2X (SDS) (125 mmol/L Tris-HCL pH 6.8; SDS al 4%, glicerol al 20% y 2-mercaptoetanol al 10%) a una relación 1: 1 y se calentaron durante 5 minutos a 100°C. Las proteínas (20 μ g) se separaron mediante SDS-PAGE al 7.5% y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore, Waltham, MA) y fueron inmunotransferidas. Se incluyeron marcadores de peso molecular teñidos previamente (Biorad, Hercules, CA) en cada gel. Las membranas se probaron en serie con el anticuerpo contra Stat1 pY⁷⁰¹ o Stat3 pY⁷⁰⁵ seguido de anticuerpo contra Stat1 o Stat3 (Transduction labs, Lexington, KY), luego anticuerpo contra β -actina (Abcam, Cambridge, MA). Las membranas se retiraron entre el sondeo de anticuerpos usando solución reguladora Restore™ Western Blot Stripping (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) según las instrucciones del fabricante. Se utilizó IgG de cabra antiratón conjugada con peroxidasa de rábano picante como anticuerpo secundario (Invitrogen Carlsbad, CA) y las membranas se desarrollaron con un sistema de detección de quimioluminiscencia (ECL) mejorado (Amersham Life Sciences Inc., Arlington Heights, IL).

Cribado de similitud. Tres compuestos identificados en el cribado virtual de ligandos inicial (VLS) -Com3 (no reivindicado), Com30 y Com188 inhibieron la unión de unión de SH2 de Stat3/péptido pY y la fosforilación de Stat3 mediada por IL-6 y se eligieron como moléculas de referencia para el cribado de similitud. Una solicitud de similitud de huella digital para cada compuesto de referencia se envió a Molcart/ICM (Distancia Máxima, 0.4). Se calculó la similitud entre cada molécula de referencia y cada molécula de base de datos y los resultados de similitud se clasificaron en orden decreciente de puntuación de similitud ICM (Eckert and Bajorath 2007). Las bases de datos buscadas incluyeron ChemBridge, LifeChemicals, Enamine, ChemDiv, Asinex, AcbBlocks, KeyOrganics y PubChem para un total de 2.47 millones de compuestos. Todos los compuestos identificados se acoplaron en el bolsillo de unión del dominio SH2 de Stat3 in silico. Los compuestos que cumplían los criterios de CIA se adquirieron y ensayaron como se describe para los compuestos identificados en la criba primaria.

5 Ensayo de cambio de movilidad electroforético (EMSA): Se realizó EMSA usando el oligonucleótido dúplex radiomarcado con hSIE como una sonda como se describe (Tweardy et al., 1995). En resumen, se prepararon extractos de alto contenido de sal a partir de células HepG2 incubadas sin o con IL-6 (30 ng/ml), durante 30 minutos. La concentración de proteína se determinó mediante ensayo Bradford y se incubaron 20ug de extracto con el compuesto (300uM) durante 60 minutos a 37°C. La sonda hSIE unida y no unida se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (4.5%). Los geles se secaron y se sometieron a autorradiografía.

10 Modelado molecular. Todas las configuraciones 3-D del dominio SH2 de Stat3 complejadas con compuestos se determinaron por optimización de energía global que implica múltiples etapas: 1) localización de las moléculas orgánicas se ajustó en su conjunto en 2 Å de amplitud mediante traducciones al azar y rotaciones pseudo-brownianas alrededor del centro molecular de gravedad, 2) las variables internas de las moléculas orgánicas fueron cambiadas al azar, 3) los grupos acoplados dentro de los ángulos de torsión de la cadena lateral del dominio SH2 de Stat3 se muestrearon con agitación de probabilidad sesgada mientras se fijaron las variables restantes de la proteína, 4) las minimizaciones de energía local se realizaron usando el Empirical Conformation Energy Program for Peptides type-3 (ECEPP3) con vacío (Nemethy et al., 1992) con una constante dieléctrica dependiente de la distancia $\epsilon = 4r$, la energía de solvente basada en la superficie y las contribuciones entrópicas de las cadenas laterales de la proteína evaluadas se adicionaron y 5) conformaciones del complejo, que fueron determinadas por criterios Metropolis, se seleccionaron para el siguiente ciclo de barrido-conformación. La configuración tridimensional inicial del dominio SH2 de Stat1 en un complejo con cada compuesto se predijo y se generó superponiendo, dentro del modelo computacional, las características tridimensionales del SH2 de Stat1 sobre la configuración tridimensional del dominio SH2 de Stat3 en un complejo con cada compuesto. 20 El modelo computacional final de SH2 de Stat1 en un complejo con cada compuesto se determinó mediante minimización local usando la mecánica molecular basada en Internal Coordinate Force Field (ICFF) (Totrov and Abagyan 1997). Los inventores calcularon la energía de van der Waals del complejo de Stat1 o 3-SH2 unido a cada compuesto usando el potencial de Lennard-Jones con campo de fuerza ECEPP/3 (Nemethy et al., 1992).

25 Microscopía de fluorescencia confocal y de alto rendimiento. La microscopía de fluorescencia confocal y de alto rendimiento (HTFM) de células MEF/GFP-Stat3 α se realizaron como se describe (Huang et al., 2007). En resumen, para la microscopía de fluorescencia confocal, las células se hicieron crecer en placas de 6 pozos que contenían un cubreobjetos. Para HTFM, las células se sembraron en placas CC3 de 96 pozos a una densidad de 5,000 células/pozo usando un sistema de siembra en placas automatizado. Las células se cultivaron en condiciones estándar hasta 85-90% confluentes. Las células se trataron previamente con el compuesto durante 1 hora a 37°C, luego se estimularon con IL-6 (200 ng/ml) e IL-6sR (250 ng/ml) durante 30 minutos. Las células se fijaron con formaldehído al 4% en solución reguladora PEM (PIPES de potasio 80 mM, pH 6.8, EGTA 5 mM pH 7.0, MgCl₂ 2 mM) durante 30 minutos a 4°C, se inactivaron en 1 mg/ml de NaBH₄ (Sigma) en solución reguladora PEM y se contratificaron durante 1 min en 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI Sigma, 1 mg/ml) en solución reguladora PEM. Se revisaron los cubreobjetos por microscopía confocal fluorescente. Las placas se analizaron mediante HTFM automatizado usando la plataforma Cell Lab IC Image Cytometer (IC100) y el software de análisis CytoshopVersion 2.1 (Beckman Coulter). La translocación nuclear se cuantifica usando la medición de la fracción localizada en el núcleo (FLIN) (Sharp et al., 2006). 35

40 Ensayo de apoptosis de la línea celular de cáncer de mama. Las líneas celulares de carcinoma de mama humano MDA-MB-468, MDA-MB-231, MBAMD-435 y MCF7 fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Powel H. Brown (Breast Cancer Center, Baylor College of Medicine). La línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-453 fue amablemente proporcionada por el Dr. Shou Jiang (Breast Cancer Center, Baylor College of Medicine). Todas las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 25,000 unidades de penicilina G, 25,000 ug de estreptomina y 131.4 mg de L-glutamina y se cultivaron en la incubadora bajo condiciones de 95% de aire, 5% de CO₂ a 37°C (Garcia et al., 2001). Las células se sembraron a 2,500 células/cm² en placas de 12 pozos. A una confluencia del 80%, las células se lavaron con PBS y se suplementaron con medio fresco que contenía compuesto o el inhibidor de la topoisomerasa I, camptotecina, a 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M. A las 24 horas, el tratamiento se terminó eliminando el medio de cada pozo. Las células se lisaron con solución reguladora de lisis celular (600 μ l, durante 30 minutos a 25°C). El lisado celular (200 μ l) se centrifugó a 200xg durante 10 minutos y se ensayaron 20 μ l de cada sobrenadante para nucleosomas usando el ELISA de detección de muerte celular (Roche Applied Science) según lo descrito por el fabricante. El porcentaje máximo del nivel de nucleosoma se calculó dividiendo el nivel de nucleosomas por el nivel máximo de nucleosomas alcanzado en el ensayo y multiplicando por 100. Este valor se representó como una función de la concentración log del compuesto y la curva de ajuste óptimo generada usando el software IDBS, 4-Parameter Logistic Model/Dose Response/XLfit 4.2. 50

Ejemplo 2

55 Identificación por VLS de compuestos que bloquearon la unión de STAT3 con su fosfopéptido ligando e inhibieron la fosforilación mediada por IL-6 de STAT3

El protocolo VLS se utilizó para evaluar un total de 920,000 compuestos similares a fármacos. De éstos, 142 compuestos cumplieron los criterios de CIA. Estos compuestos se adquirieron y ensayaron para determinar su

capacidad para bloquear la unión de Stat3 con su ligando fosfopéptido en un ensayo de unión basado en resonancia del plasmón de la superficie (SPR) y para inhibir la fosforilación mediada por IL-6 de Stat3. Los experimentos de competición de SPR mostraron que, de los 142 compuestos ensayados, 3 compuestos -Com3 (no reivindicado), Com30 y Com188- eran capaces de competir directamente con péptido pY para la unión a Stat3 con valores de IC₅₀ de 447, 30 y 20 μM, respectivamente (figuras 1 y 3, Tabla 4).

Tabla 4. Valores de IC₅₀ (μM) de 6 compuestos activos

Ensayo	Com3 reivindicado	(no)	Com30	Com188	Com3-2 reivindicado	(no)	Com3-7 reivindicado	(no)	Com30-12
SPR	447 ¹		30	20	256		137		114
pStat3	91		18	73	144		63		60
HTM	131		77	39	150		20		>300

¹Datos presentados son la media o media ± SD; ND = no determinado.

Además, cada compuesto inhibía la fosforilación mediada por IL-6 de Stat3 con valores de IC₅₀ de 91, 18 y 73 μM respectivamente (figura 2, Tabla 4).

El cribado de similitud con Com3 (no reivindicado), Com30 y Com188 identificó 4,302 compuestos adicionales. Se realizó un cribado VLS con cada uno de estos compuestos, que identificó 41 compuestos que cumplían los criterios de CIA; Estos fueron comprados y probados. Los experimentos de competición SPR mostraron que, de estos 41 compuestos, 3 compuestos -Com3-2 (no reivindicado), Com3-7 (no reivindicado) y Com30-12- eran capaces de competir directamente con péptido pY para la unión a Stat3 con valores de IC₅₀ de 256, 137 y 114 μM, respectivamente (figuras 1 y 3, Tabla 4). Además, cada compuesto inhibía la fosforilación mediada por IL-6 de Stat3 con valores de IC₅₀ de 144, 63 y 60 μM, respectivamente (figura 2, Tabla 4).

Ejemplo 3

Inhibición mediada por compuesto de la fosforilación estimulada por ligando de STAT3 es específica para STAT3 vs. STAT1

Aunque Stat3 contribuye a la oncogénesis, en parte, a través de la inhibición de la apoptosis, Stat1 es anti oncogénico; Actúa como mediador de los efectos apoptóticos de los interferones y contribuye a la vigilancia tumoral Kaplan et al., 1998; Ramana et al., 2000). Por consiguiente, los compuestos que se dirigen a Stat3 mientras preservan Stat1, dejando sus funciones anti oncogénicas sin oposición, pueden dar como resultado un efecto antitumoral sinérgico. Para evaluar la selectividad de los compuestos de Stat3 frente a Stat1, se incubaron células HepG2 con Com3 (no reivindicado), Com30, Com188, Com3-2 (no reivindicado), Com3-7 (no reivindicado) y Com30-12 (300 μM) durante 1 hora a 37°C antes de la estimulación con IFN-γ (figura 4). Sólo el tratamiento con Com30-12 bloqueó la fosforilación de Stat1 mientras que cada uno de los otros cinco compuestos -Com3 (no reivindicado), Com30, Com188, Com3-2 (no reivindicado) y Com3-7 (no reivindicado)- no. De este modo, cinco de los seis compuestos de ejemplo identificados fueron selectiva e inhibieron la fosforilación estimulada por el ligando de Stat3, pero no de Stat1.

Ejemplo 4

Análisis secuencial y modelado molecular de la interacción de cada compuesto con el dominio SH2 de STAT3 vs. STAT1

Para comprender a nivel molecular la base para la selectividad de los Coms 3, 30, 188, 3-2 y 3-7 y la ausencia de selectividad en el caso de Com 30-12, se compararon la secuencia de aminoácidos y las estructuras disponibles del dominio SH2 de Stat1 y Stat3 y también se examinó cómo cada compuesto interactuaba con ambos. La alineación de secuencias reveló identidad en los residuos dentro de Stat3 y Stat1 correspondientes al sitio de unión para el residuo pY y el residuo +3 (figura 5A). Además, la superposición de las estructuras SH2 de Stat3 y Stat1 reveló que los bucles que contenían estos sitios de unión se superpusieron (figura 5B). Por el contrario, la alineación de secuencias reveló diferencias sustanciales en la secuencia de las regiones del dominio SH2 correspondientes a los bucles que forman el sitio de unión hidrófobo (figura 5A). Además, la revisión de la superposición de los dominios SH2 de Stat3 y Stat1 reveló que, en contraste con la aposición cercana de los dos bucles de Stat3 que forman el sitio de unión hidrófobo, los dos bucles correspondientes de Stat1 no están estrechamente unidos para formar un bolsillo (figura 5B).

La revisión de modelos computacionales de Com3 (no reivindicado), Com30, Com188, Com3-2 (no reivindicado) y Com3-7 (no reivindicado) en un complejo con el dominio SH2 de Stat3 reveló que cada uno tiene interacciones significativas con bolsillo de unión del dominio SH2 de Stat3 en los tres sitios de unión, el sitio de unión del residuo pY, el sitio de unión del residuo +3 y el sitio de unión hidrófobo (figuras 6A, B, C, D y E). Por el contrario, Com30-12 interactúa con el sitio de unión del residuo pY y bloquea el acceso al sitio de unión del residuo +3 pero no interactúa ni bloquea el acceso al sitio de unión hidrófobo (figura 6F). Además, las energías de van der Waals de los 5 compuestos selectivos eran mucho más favorables para su interacción con los bucles de Stat3 que formaban el sitio de unión hidrófobo que con los bucles correspondientes de Stat1 (figura 5C). De este modo, el modelado informático indicó que la actividad de los compuestos contra Stat3 deriva de su capacidad de interactuar con los sitios de unión para los residuos pY y +3 dentro del bolsillo de unión, mientras que la selectividad para Stat3 frente a Stat1 deriva de la capacidad de los compuestos para interactuar con el sitio de unión hidrófobo dentro del bolsillo de unión de SH2 de Stat3, que servía como un filtro de selectividad.

Ejemplo 5

15 Inhibición de la translocación nuclear de STAT3 fosforilado por COM3 (no reivindicado), COM30, COM188, COM3-2 (no reivindicado) y COM3-7 (no reivindicado) evaluado por HTFM

Después de su fosforilación sobre Y705, Stat3 experimenta un cambio en la conformación de la dimerización cabeza a cabeza mediada a través de su dominio de oligomerización N-terminal a dimerización cola a cola mediada por interacciones recíprocas de ligando peptídico SH2/pY705. Este cambio conformacional es seguido por la acumulación nuclear. Se esperaba que los compuestos que se orientaban a las interacciones de ligando de péptido SH2/pY de Stat3 inhibieran la acumulación nuclear de Stat3. Para determinar si esto era el caso con los compuestos en este documento, se empleó un ensayo de translocación nuclear (figura 7) usando células de fibroblastos embrionarios murinos (MEF) que son deficientes en Stat3 endógeno, pero expresan constitutivamente Stat3 α marcado con GFP a niveles endógenos, MEF/GFP-Stat3 α (Huang et al., 2007). La preincubación de células MEF/GFP-Stat3 α con Com3 (no reivindicado), Com30, Com188, Com3-2 (no reivindicado) y Com3-7 (no reivindicado), pero no Com30-12, translocación nuclear mediada por ligando bloqueada de GFP-Stat3 α con valores de IC₅₀ de 131, 77, 39, 150 y 20 μ M (figura 7 y Tabla 4).

Ejemplo 6

Desestabilización de complejos de STAT3-ADN por COM3 (no reivindicado) y COM3-7 (no reivindicado)

Una vez en el núcleo, los dímeros Stat3 se unen a elementos de ADN específicos para activar y, en algunos casos, reprimir la transcripción de genes. Se ha demostrado previamente que los dodecapéptidos fosforilados con tirosina basados en motivos dentro de receptores que reclutan Stat3 desestabilizan Stat3 (Chakraborty et al., 1999, Shao et al., 2003). Se podría esperar que los compuestos que se unen al sitio de unión al fosopéptido de Stat3 hagan lo mismo. Para determinar si esto era el caso para cualquiera de los compuestos que identificamos, se incubaron extractos de células HepG2 estimuladas con IL-6 en reacciones de unión que contenían hSIE radiomarcado (figura 8) y cada uno de los cinco compuestos selectivos (300 μ M). La incubación con Com3 (no reivindicado) o Com3-7 (no reivindicado) redujo la cantidad de hSIE desplazada a la mitad o mayor. Los otros compuestos no tuvieron un efecto detectable en la intensidad de la banda Stat3: hSIE. De este modo, 2 de los 5 compuestos selectivos desestabilizaron los complejos Stat3: hSIE.

Ejemplo 7

40 Inducción de apoptosis de líneas celulares de cáncer de mama por COM3 (no reivindicado), COM30 y COM188; la apoptosis es selectiva para líneas celulares con activación constitutiva de STAT3

Los compuestos previamente identificados que se dirigen a Stat3 inducen la apoptosis celular (Jing et al., 2004; Song et al., 2005; Jing et al., 2006; Schust et al., 2006; Siddiquee et al., 2007). Para determinar si alguno de los compuestos de Stat3 selectivos inducen apoptosis y si o no la inducción de apoptosis es selectiva para las líneas de células tumorales con activación constitutiva de Stat3, se examinaron los compuestos selectivos de Stat3 en este documento para determinar la capacidad de inducir la apoptosis de las líneas celulares de cáncer de mama, MDAMB-231 (Cailleau R 1978; Satya-Prakash KL 1981; Zhang RD 1991), MBA-MB-468 (Brinkley et al., 1980; Garcia et al., 1997; Garcia et al., 2001) y MDAMB-435 (Brinkley et al., 1980; Garcia et al., 2001) con Stat3 constitutivamente activa y dos líneas celulares de cáncer de mama, MDA-MB-453 (Brinkley et al., 1980; Garcia et al., 2001; Song et al., 2005) y MCF7 (Song et al., 2005), sin Stat3 constitutivamente activo.

50 Dos compuestos -Com3 (no reivindicado) y Com30- indujeron la apoptosis de las tres líneas celulares de cáncer de mama con actividad de Stat3 constitutiva MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MDA-MB-435 (figuras 9A, B y C) con valores de EC₅₀ de 2.3 a 26.9 μ M y los intervalos de 6.4 a 92.2 μ M, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5 Valores de EC50 (μM) para inhibidores selectivos de Stat3

Línea celular	Com3 (no reivindicada)	Com30	Com188	CAM ¹
MDA-MB-468	2.28 ²	6.42	0.73	0.74
MDA-MB-231	26.91	92.01	3.96	1.62
MDA-MB-435	16.5	16.29	7.01	1.64
MCF7	>300	>300	17.19	0.13
MDA-MB-453	>300	>300	15.5	0.93
¹ CAM-camptotecina				
² Los datos presentados son la media.				

Por el contrario, ninguno de los compuestos indujo la apoptosis de las líneas celulares MDA-MB-453 y MCF7 que no demuestran actividad constitutiva de Stat3 en concentraciones de hasta 300 μM (figuras 9D y E y Tabla 5). Com188 fue aún más eficaz para inducir la apoptosis de líneas celulares con actividad constitutiva de Stat3 (figuras 9A, B y C) que demuestra valores de EC50 en el intervalo de 0.7 a 7 μM (Tabla 2). Sin embargo, a diferencia de Com3 (no reivindicado) y Com30, Com188 también tenía actividad detectable contra MDA-MB-453 y MCF7 (figuras 9D y E), demostrando valores de EC50 de 17.2 y 15.5 μM , respectivamente. Sin embargo, similar a Com3 (no reivindicado) y Com30, Com188 mostró actividad preferencial contra líneas celulares con actividad constitutiva de Stat3 (Tabla 5). En contraste con Com3 (no reivindicado), Com30 y Com188 ni Com3-2 (no reivindicado) ni Com3-7 (no reivindicado) indujeron la apoptosis de ninguna de las líneas celulares de cáncer de mama ensayadas.

Ejemplo 8

Significado de ciertas realizaciones de la presente invención

Para desarrollar sondas químicas que se dirigen selectivamente a Stat3, los inventores cribaron virtualmente 920,000 pequeños compuestos similares a fármacos acoplando cada uno de ellos al bolsillo de unión del péptido pY del dominio SH2 de Stat3, que consiste en tres sitios: el sitio de unión pY, el sitio de unión del residuo +3 y un sitio de unión hidrófobo. Tres compuestos satisfacían criterios de análisis de interacción, inhibían la unión de Stat3 recombinante a su ligando del péptido pY inmovilizado e inhibían la fosforilación de tirosina mediada por IL-6 de Stat3. Estos compuestos se usaron en una criba de similitud de 2.47 millones de compuestos, la cual identificó 3 compuestos más activos. El examen de los 6 compuestos positivos para determinar la capacidad para inhibir la fosforilación de Stat1 mediada por IFN- γ reveló que 5 de 6 eran selectivos para Stat3 frente a Stat1. La secuencia y el análisis estructural de los dominios SH2 de Stat3 y Stat1 revelaron que la capacidad del compuesto para interactuar con el sitio de unión hidrófobo era la base para la selectividad. Los 5 compuestos selectivos inhibieron la translocación de núcleo a citoplasma de Stat3, mientras que 3 de 5 indujeron preferencialmente apoptosis de líneas celulares de cáncer de mama con activación constitutiva de Stat3 con uno (Com188) activo en el intervalo submicromolar. De este modo, el cribado virtual de ligandos de bibliotecas de compuestos orientados al bolsillo de unión del péptido pY del dominio SH2 de Stat3 identificó por primera vez 3 compuestos de plomo que inhiben competitivamente la unión del dominio SH2 de Stat3 a su ligando del péptido pY, dirigen selectivamente a Stat3 frente a Stat1 e inducen apoptosis preferencialmente de líneas celulares de cáncer de mama con Stat3 constitutivamente activado.

Se han identificado recientemente varias moléculas que dirigen Stat3 (Bhasin et al., 2007; Jing et al., 2004; Coleman et al., 2005; Song et al., 2005; Schust et al., 2006; Siddiquee et al., 2007). Los estudios de polarización de fluorescencia indicaron que un peptidomimético, hidrocinaomil-Tyr(PO₃H₂)-Leu-cis-3,4-metanoPro-Gln-NHB, era un potente inhibidor de la unión de Stat3 a la unión del péptido pY con una IC₅₀ de 125 nM (Coleman et al. Al., 2005). Los resultados de su capacidad para inhibir la fosforilación de Stat3 o la translocación nuclear dentro de las células no se ha informado reflejando, tal vez, el obstáculo general de la permeabilidad celular planteada por la clase peptidomimética de fármacos.

El oligodesoxinucleótido formador de cuarteto rico en G, T40214, se identificó como un inhibidor de Stat3 a través de estudios de acoplamiento de T40214 sobre la estructura conocida de Stat3 (Jing et al., 2003). T40214 orientó homodímeros cola a cola de Stat3, disminuyó la unión de Stat3 al ADN e inhibió el crecimiento de células cancerosas de próstata, mama y pulmón en el modelo de ratón xenoinjerto desnudo modelo a través de la inducción de apoptosis (Jing et al., 2003; Jing et al., 2004; Jing and Tweardy 2005; Jing et al., 2006; Zhu and Jing 2007). T40214 se administra IV o

por vía intraperitoneal en un complejo con polietilenimina, que mejora en gran medida la captación intracelular. Para complementar estos esfuerzos y desarrollar una clase diferente de inhibidor de Stat3 para su uso en el tratamiento contra el cáncer con el potencial para la administración oral, se determinó si la información reciente obtenida con respecto a los requisitos estructurales de unión de SH2 de Stat3/péptido pY (Shao et al., 2004; Shao et al., 2006) podrían ser explotados para desarrollar un pequeño inhibidor molecular de Stat3.

Otros grupos han adoptado un enfoque de moléculas pequeñas para dirigir Stat3 con cierto éxito. STA-21 es un inhibidor de Stat3 de molécula pequeña identificada mediante el cribado virtual de ligandos de compuestos que se unen a la interfase de los homodímeros de SH2 de Stat3 (Song et al., 2005). El tratamiento con STA-21 de las células alteró los complejos Stat3/ADN, anuló la translocación de Stat3 en el núcleo, inhibió la expresión de proteínas tales como Bcl-XL y Ciclina D1 e indujo la apoptosis de líneas celulares de cáncer de mama. No se proporcionaron pruebas de que STA-21 se uniera directamente a Stat3 reflejando, tal vez, la falta de disponibilidad de reactivos apropiados, esto es, homodímeros de Stat3 purificados. Más recientemente, se ha propuesto un modelo de interacción de STA-21 con el bolsillo de unión del péptido pY de SH2 de Stat3, que presentaba el 1-oxígeno de la unión de STA-21 al hidrógeno de amonio de cadena lateral de Arg609 en el sitio de unión del residuo pY. La modificación química de STA-21 se llevó a cabo con el objetivo de generar compuestos con una mejor interacción en este sitio. Ellos sintetizaron 4 compuestos de los cuales el más potente demostró actividad similar a STA-21 con una EC_{50} para la inducción de apoptosis de tres líneas celulares de cáncer de próstata dependientes de Stat3 con actividad constitutiva de Stat3 de 13.4 a 34.1 μ M (Bhasin et al., 2007).

Schust (Schust et al., 2006) identificó otro inhibidor de moléculas pequeñas de Stat3, Stattic, usando un ensayo de alto rendimiento de polarización de fluorescencia de unión a Stat3. Este grupo cribó 17,298 compuestos químicos e identificó 144 compuestos con actividad significativa en este ensayo. El compuesto más activo, Stattic, inhibió la unión de Stat3 a un ligando del péptido pY semejante, inhibió la fosforilación de Stat3 mediada por el ligando y la translocación nuclear, redujo la unión de Stat3 al ADN e indujo la apoptosis de células cancerosas de mama con Stat3 constitutivamente activado en el intervalo 5-20 μ M. Similar a los compuestos identificados en este documento, la inhibición de la fosforilación inducida por ligando fue selectiva para Stat3 frente a Stat1. Sin embargo, a diferencia de los compuestos en este documento, la inhibición de Stat3 por Stattic fue bloqueada por la presencia de un agente reductor (DTT), no fue reversible y no se pudo medir por la inhibición directa de la unión del péptido pY. Más bien, Stattic puede alterar la forma del sitio de unión del péptido SH2 de Stat3 mediante la acilación del residuo Cys687 en el lado opuesto del dominio SH2 (McMurray 2006).

Siddiquee et al., (Siddiquee et al., 2007) identificaron recientemente un inhibidor de molécula pequeña de Stat3, S3I-201, usando un enfoque similar al descrito en este documento orientándose al sitio de unión del péptido pY de SH2 de Stat3. S3I-201 inhibió la homodimerización de Stat3, la unión al ADN, la inducción de ciclina D1, Bcl-xL y survivina y la apoptosis inducida de células NIH3T3 transformadas con v-Src y líneas celulares de cáncer de mama con Stat3 activo constitutivo en el intervalo de 30 a 100 μ M. Similar a T40214, S3I-201 (5 mg/kg cada 2-3 días) inhibió el crecimiento de xenoinjertos de ratones desnudos de una de estas líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231). Similar a STA-21, y a diferencia de los compuestos de la presente invención, no se presentó evidencia de la capacidad de S3I-201 para unir directamente Stat3 o para inhibir la unión de Stat3 a su ligando del péptido pY dejando abierta la cuestión del mecanismo preciso de acción de S3I-201.

El uso de modelado molecular para delinear la base estructural para la inhibición competitiva de la unión del péptido SH2 de Stat3/pY por los compuestos descritos en este documento identificó el sitio de unión hidrófobo como un filtro de selectividad. También proporciona una base racional para la modificación de los tres compuestos de plomo para identificar los relacionados con mayor potencia; estos estudios están en marcha. Además, la estrategia empleada en este documento puede emplearse para desarrollar sondas químicas selectivas para otros miembros de la familia de las proteínas STAT. Además de Stat3 y Stat1, la información estructural actualmente está disponible para Stat5A (Neculai et al., 2005). La superposición de los dominios SH2 de Stat5A y Stat1 y Stat5A y Stat3 reveló diferencias en el sitio de unión péptido pY de Stat5A y ambos Stat1 y Stat3. En ciertos casos, el cribado VLS se emplea para explotar estas diferencias para identificar sondas químicas selectivas de Stat5 para su uso en estudios genómicos químicos y como terapia potencial para cánceres en los que Stat5 contribuye a la oncogénesis.

Ejemplo 9

Visión general del direccionamiento de células madre cancerosas con inhibidores de stat3

En ciertos casos, hay desarrollo de sondas potentes y selectivas para cuestionar la función de Stat3 en células madre. En casos específicos, Stat3 es dispensable para la función de células madre/progenitoras hematopoyéticas normales, pero no para células madre cancerosas, en particular, células madre leucémicas, por ejemplo. En casos particulares, las sondas únicas evitan las células madre hematopoyéticas normales mientras se dirigen a células madre leucémicas, así como a otras células madre cancerosas.

- Hipótesis de células madre. La hipótesis de que una población menor de células es capaz de dar origen a todos los tipos de células parenquimatosas maduras dentro de un sistema de órganos ganó apoyo experimental en la década de 1960 de los ensayos de formación de colonias in vitro y la demostración de que el trasplante de médula ósea podría reconstituir el sistema hematopoyético de ratones irradiados letalmente. La hipótesis de células madre se estableció clínicamente en los años 1970 y 1980 a través de la ejecución exitosa de trasplante de médula ósea y se extendió durante la década de 1990 para incluir todos los sistemas de órganos convirtiéndose así en uno de los principios centrales de la medicina regenerativa. Más recientemente, la hipótesis de las células madre ha surgido dentro del campo del cáncer. La opinión actual sostiene que las terapias curativas para muchos cánceres refractarios casi ciertamente requerirán el direccionamiento exitoso de las células madre cancerosas.
- La capacidad para sondar químicamente las células madre tanto normales como cancerosas es esencial para comprender y controlar su función para tratar individuos con deficiencias en el número o función de células maduras o para tratar o curar pacientes con cáncer. En particular, curar el cáncer requerirá el desarrollo de fármacos que se dirigen a las células madre cancerosas, al tiempo que se preservan células madre normales en al menos ciertos aspectos.
- Stat3 y células madre. Se está acumulando evidencia de que Stat3 es necesario para el mantenimiento de algunas células madre normales, por ejemplo, células madre embrionarias, y muchos tipos de células madre malignas, incluyendo células madre de leucemia mieloide aguda (AML) y cáncer de mama, por ejemplo. La comprensión total del papel de Stat3 en la biología de células madre ha sido obstaculizada por el descubrimiento de que los ratones con deficiencia genética de Stat3 de todo el animal son embrionarios letales a los 6.5 a 7 días (Takeda et al., 1997). Además, los resultados de los estudios de deficiencia genética específicos de tejidos a menudo han producido resultados contradictorios y confusos (Levy and Lee, 2002). Las sondas químicas de Stat3 específicas y altamente activas aclaran en gran medida la comprensión del papel de Stat3 en las células madre y proporcionan herramientas para cuestionar específicamente la función Stat3 en las células madre cancerosas.
- En ciertos casos, los métodos y composiciones son útiles en oncología y asma, por ejemplo. El asma, por ejemplo, es un proceso de la enfermedad en el cual Stat3 juega un papel crítico.
- Enfoque en células madre mieloides normales y leucémicas, por ejemplo. En ciertos aspectos de la invención, los agentes dirigidos a las células madre cancerosas evitan las células madre hematopoyéticas normales porque de lo contrario su uso tendría consecuencias letales hematológicas e inmunes. La AML está entre los 10 cánceres más comunes. A pesar de los avances sustanciales en su tratamiento, la mortalidad de 5 años supera el 50%. La curación exitosa de la AML, así como de otros cánceres refractarios, implicará la eliminación de las células madre leucémicas mientras se preservan células madre normales dentro de la médula ósea. Las terapias citorreductoras actuales para la AML y otros cánceres se dirigen a las células cíclicas. El sistema hematopoyético es capaz de reconstituirse por sí mismo después de la terapia citorreductora debido a que las células madre hematopoyéticas no son cíclicas. Al igual que las células madre normales, las células madre cancerosas son quiescentes y no ciclistas. Los nuevos regímenes terapéuticos para el cáncer incluyen agentes que se dirigen a células madre cancerosas no cíclicas, en ciertos aspectos. Sin embargo, en casos particulares, los agentes que se dirigen a las células madre cancerosas preservan células madre hematopoyéticas normales para permitir la reconstitución de este sistema de órganos.
- Aunque Stat3 es esencial para el mantenimiento de células madre embrionarias (Raz et al., 1999), la delección de Stat3 dentro del linaje hematopoyético incluyendo células madre hematopoyéticas de ratones normales no da lugar a una disminución de la producción de células sanguíneas. De hecho, las células circulantes dentro del linaje de granulocitos están aumentadas en estos ratones (Lee et al., 2002). En contraste con el hecho de no tener ningún papel en la hematopoyesis de reposo normal, Stat3 se activa en hasta 95% de las muestras de blastos leucémicos y puede ser crítico para la supervivencia de estas células (Spiekermann et al., 2001). En ciertos aspectos, esto es cierto para las células madre leucémicas mientras que en otros aspectos la activación de Stat3 dentro de estas células es crítica para su supervivencia. En la presente divulgación, las sondas químicas de alta afinidad y selectivas para Stat3 que se usan para determinar si Stat3 es crítica para la supervivencia de células madre leucémicas y si Stat3 puede ser dirigida en células progenitoras/hematopoyéticas sin efectos perjudiciales.
- La leucemia aguda en seres humanos surge de progenitores de células sanguíneas dentro de la vía mieloide o linfoide. El hallazgo más sorprendente en la leucemia aguda es la translocación cromosómica adquirida somáticamente, no aleatoria en hasta un 60% de los pacientes con leucemia aguda. Estas translocaciones cromosómicas activan anormalmente los genes del factor de transcripción en la leucemia mieloide aguda (AML) y la leucemia linfoblástica aguda (ALL) y muestran una notable especificidad para las células hematopoyéticas bloqueadas en etapas definidas de la diferenciación de las células sanguíneas. AML comprende un grupo heterogéneo de leucemias agudas derivadas de precursores mieloides transformados malignamente. Recientemente, la WHO clasificó la AML con translocaciones cromosómicas recurrentes (60% de todas las AML) en cuatro categorías principales: i) leucemia promielocítica aguda (APL) con t(15; 17) (resultando en el gen de fusión PML-RAR α) y variantes, ii) AML con t(8; 21) (resultando en el gen de fusión AML1-ETO), iii) AML-M4 con eosinófilos anormales de médula ósea e inv(16) (resultando en el gen de fusión

CBF β -MYH11) Y iv) AML con anomalías 11q23 (gen de fusión MLL, tal como MLL-AF9), que se caracterizan por características biológicas y de pronóstico distintas.

5 La leucemia promielocítica aguda (APL) es un subtipo distinto de leucemia mieloide aguda (AML) que comprende aproximadamente el 10% de los casos de AML. En APL, la fusión del receptor de ácido retinoico-alfa (RAR α) con el gen que codifica para la proteína PML, la translocación PML-RAR α t(15:17), es necesaria para el bloqueo de la diferenciación de células mieloides. Los ácidos retinoicos, que se usan para tratar este cáncer, se unen al componente receptor de ácido retinoico (RAR α) del producto de fusión, resultando en la degradación de la proteína de fusión por ubiquitinización (Melnick and Licht, 1999). Sin embargo, las recaídas son frecuentes y suelen ser resistentes al

10 La translocación cromosómica t(8; 21) se encuentra en el 15-20% de los casos de AML. Entre las aberraciones cromosómicas no aleatorias observadas en AML, t(8; 21) es la translocación cromosómica más común conocida en la leucemia humana y por lo general se correlaciona con el subtipo M2 de AML de la clasificación franco-estadounidense-británica, con unas características morfológicas específicas y bien definidas. La translocación entre los cromosomas 8 y 21 se considera un sello citogenético del subtipo M2 de la leucemia mieloide aguda. AML1 se expresa normalmente en células hematopoyéticas y pertenece a una familia de factores de transcripción que se define por el dominio de homología runt (RHD), un motivo de unión al ADN. AML1 es una proteína de unión al ADN específica de secuencias que forma complejos con el factor de unión de núcleo β (CBF β) para activar la transcripción de genes diana. CBF β no se une por sí mismo al ADN, sino que aumenta la afinidad de AML1 con el ADN. CBF β suele estar involucrado en una translocación diferente que implica la inversión del cromosoma 16, que produce un gen de fusión CBF β -SMMHC.

20 Para evaluar el impacto de las oncoproteínas de fusión que contienen RAR α y AML1 en células de médula ósea primarias, el Dr. Dong y sus colegas realizaron ensayos de transducción y transformación retrovirales (RTTA) usando estas proteínas de fusión (Zeisig et al., 2007; Kwok et al., 2006; Kwok et al., 2009). Estos estudios de células hematopoyéticas primarias usando RTTA revelaron el impacto de estas proteínas de fusión en la promoción de la autorenovación de células madre leucémicas y proporcionaron un sistema fisiológicamente relevante para estudiar las propiedades de transformación de estas proteínas de fusión. En la presente divulgación, los inventores amplían el uso de RTTA en una plataforma para el descubrimiento de fármacos, en particular, para identificar sondas químicas de Stat3 que dirigen selectivamente y matan células madre AML, por ejemplo, generadas por estas proteínas de fusión al tiempo que preservan células madre hematopoyéticas normales.

Ejemplo 10

30 Un enfoque de ejemplo para los inhibidores de Stat3 de las células madre cancerosas

En el campo del desarrollo de sondas de Stat3, los inventores se han centrado en sondas de Stat3 de molécula pequeña (Xu et al., 2009), y son útiles varias características del programa de moléculas pequeñas, que incluyen: 1) un modo de acción claramente definido de estas sondas: se dirigen al dominio (SH)₂ de Stat3 Src-homología que está implicado en 2 etapas en la vía de activación de Stat3; 2) su especificidad de acción; y 3) el potencial para el uso de sondas de plomo identificadas hasta el momento para identificar sondas con 2 a 3 logs de mayor actividad basada en el análisis SAR de ejemplo y reciente y las consideraciones de química médica que se describen a continuación.

40 En casos específicos, la afinidad del compuesto se mejora al obtener una mayor afinidad logarítmica al pasar de sondas de 1^a generación a 2^a generación usando análisis de farmacóforo 3-D. Además, la selectividad se mejora mediante el modelado, en particular a través de la identificación de un dominio de unión hidrófobo distinto en el bolsillo de unión a fosfopeptidos de SH₂ de Stat3 frente al SH₂ de Stat1 (Xu et al., 2009).

Identificación de sondas químicas de Stat3 de 1^a generación. Para desarrollar sondas químicas que selectivamente se dirigen a Stat3, los inventores cribaron virtualmente 920,000 pequeños compuestos similares a fármacos acoplado cada uno de ellos al bolsillo de unión del péptido del dominio SH₂ de Stat3, el cual consiste en tres sitios: el sitio de unión del residuo pY, el sitio de unión del residuo +3 y un sitio de unión hidrófobo, que sirvió como un filtro de selectividad (Xu et al., 2009). Tres compuestos (Com3 (no reivindicado), Com30 y Com188) satisfacen criterios de análisis de interacción, inhiben competitivamente la unión de Stat3 recombinante a su ligando del péptido pY inmovilizado e inhiben la fosforilación de tirosina mediada por IL-6 de Stat3. Estos compuestos se utilizaron en una criba de similitud de 2.47 millones de compuestos, los cuales identificaron 3 compuestos más (Com3-2 (no reivindicado), Com3-7 (no reivindicado) y Com30-12) con actividades similares. Los exámenes de los 6 compuestos activos para determinar la capacidad para inhibir la fosforilación de Stat1 mediada por IFN- γ revelaron que todos excepto Com30-12 eran selectivos para Stat3. El modelado molecular de los dominios SH₂ de Stat3 y Stat1 unidos al compuesto reveló que la interacción del compuesto con el sitio de unión hidrófobo era la base para la selectividad. Los 5 compuestos selectivos inhibieron la translocación núcleo a citoplasma de Stat3, mientras que 3 de 5 compuestos (Com3 (no reivindicado), Com30 y Com188) indujeron apoptosis preferencialmente de líneas celulares de cáncer de mama de ejemplo con activación constitutiva de Stat3.

Identificación de sondas químicas de Stat3 de 2ª generación. El cribado de similitud descrito anteriormente no produjo ningún éxito usando Com188, el más activo de los 3 compuestos de plomo, como el compuesto de consulta. Por consiguiente, los inventores repitieron el cribado de similitud 2-D usando el andamio de Com188 como la estructura de consulta y la biblioteca Life Chemicals, que produjo 207 éxitos. Se realizó un análisis de farmacóforo 3-D sobre estos 207 compuestos usando Ligand Scout y se compraron los 39 compuestos de puntuación superiores y se ensayó la inhibición de la unión de Stat3 a su ligando fosfopeptídico por SPR. Todos excepto seis de estos 39 compuestos tienen IC₅₀ de SPR medibles, siendo 19 con valores de IC₅₀ iguales o menores que el compuesto original y 2 (Com188-9 y Com188-15) que tienen valores de IC₅₀ un log más bajo. El examen de estos 19 compuestos ha revelado una correlación estadísticamente significativa entre las puntuaciones de farmacóforo 3-D y las IC₅₀ de SPR y así como la puntuación de farmacóforo 3-D y las IC₅₀ para la inhibición de la translocación citoplásmica al núcleo mediada por ligando (figura 15 y datos no mostrados). Además, tanto Com188-9 como Com188-15 exhibieron una mayor actividad logarítmica en la inducción de la apoptosis de la línea celular leucémica humana que el Com188 original (figura 16). Además, Com188-38 exhibió una actividad 2 log mayor que el Com188 original en la inhibición de la translocación citoplasma al núcleo en el ensayo HTFM, mientras que Com188-15 exhibió una actividad 1 log mayor que el Com188 original en la disminución de MSFE (Tabla 6). Adicionalmente, varios de los compuestos de tipo 188 de segunda generación representan una mejora sustancial con respecto a Com188 desde un punto de vista de la química medicinal, el metabolismo y la biodisponibilidad. En particular, Com188-9 carecía de ambos grupos carboxilo, lo que en casos particulares mejora la permeabilidad celular y/o el grupo tioéter, que está sometido a oxidación. R²=0.2 P=0.013 (μM)

Tabla 6: Resumen de ciertos compuestos similares a 188 de 2ª generación

Compuesto	IC ₅₀ de SPR, μM*	IC ₅₀ de HTFM, μM*	Mamósfera ~ IC ₅₀ , μM ***
188	20**	32 ± 4	30-100
188-1	6 ± 2	26 ± 4	30
188-9	3 ± 2	47 ± 21	10
188-10	8 ± 3	22 ± 19	30
188-15	2 ± 1	49	3
188-16	4 ± 0	9 ± 5	30
188-17	4 ± 2	76	30
188-18	4 ± 1	27 ± 8	30
188-38	19 ± 9	0.4 ± 0.1	10-30
* Media ± SD			
** Xu et al PLoS ONE			
*** células SUM159PT y HS578T sembradas (6 pozos por ensayo) sin o con compuesto a 1, 10 ó 100 μM, incubadas 3 d; esferas contadas el día 3.			

20

No se reivindican los Com188-1, 188-10, 188-16, 188-17, 188-18 y 188-38 de NB.

Análisis de relación estructura-actividad (SAR) de sondas de Stat3 de segunda generación. Todos los 39 compuestos de segunda generación descritos anteriormente, más el propio Com188, son derivados de N-naft-1-il-bencenosulfamida. Tras un cuidadoso análisis de sus relaciones estructura-actividad (SAR), los inventores encontraron que la mayoría de estos compuestos similares a Com188 (38 de 40: el resto de 2 son débiles y se describirán más adelante en EXP ID) se pueden dividir en tres grupos estructurales en una tendencia general de actividad disminuida, como se muestra en la figura 17. Cinco compuestos del grupo III son en realidad los progenitores de los compuestos de los grupos I y II. La adición de una variedad de grupos (el grupo -R destacado en rojo en la estructura general del grupo I en la figura 17), tal como un grupo triazol-3-il-mercapto (188-15) o un cloro (188-10), en la posición 3 del anillo de naftilamina condujo a los compuestos del grupo I, que son la serie más potente de sondas de Stat3. En un caso específico, éste es el contribuyente más importante a la actividad inhibitoria: se encuentran un total de ocho sustituyentes 3 en los compuestos del grupo I, que invariablemente aumentan la actividad en varios órdenes de magnitud.

30

La mayoría de las sondas de Stat3 en el grupo II contienen un anillo de 5 miembros que combina los grupos 3-R y 4-OR2, tal como un furano (188-11). Sin embargo, los compuestos de este grupo son, en promedio, ~5x menos activos que los compuestos del grupo I, lo que indica que en ciertos aspectos el átomo de H del grupo 4-hidroxi (destacado en azul en la estructura general del grupo I en la figura 17) es importante, por ejemplo, involucrado en un enlace de H favorable con la proteína. Carece de la capacidad de formar los atributos del enlace H para las actividades más débiles de las sondas del grupo II, en casos particulares. Estas consideraciones subyacen en el enfoque de la química medicinal descrito en el ejemplo 11.

Ejemplo 11

Química medicinal para la síntesis de sondas de stat3 sulfamida tipo 188 de 3ª generación

La estructura cristalina de Stat3 muestra que el dominio SH2 tiene una zona de unión grande, ampliamente dispersa y generalmente poco profunda con varios valles y colinas que reconocen el ligando del péptido pY (figura 19). El modelado molecular basado en estructura (acoplamiento) fue útil para identificar la contribución de la superficie de unión hidrófoba del dominio SH2 de Stat3 como un filtro de selectividad (Xu et al., 2009). Sin embargo, diferentes programas de acoplamiento dieron posturas de unión distintas para la misma sonda sobre la superficie de unión con afinidades de unión predichas similares. Los inventores por lo tanto en casos particulares, basados en los resultados SAR iniciales descritos anteriormente, usan la química medicinal tradicional para llevar a cabo un estudio de ejemplo de relación de actividad de estructura completa, para optimizar la actividad, así como la selectividad de esta nueva clase de sondas de Stat3 sulfamida. El compuesto 188-15 sirve como un andamio para fabricar los compuestos de nueva generación, como se muestra esquemáticamente a continuación (figura 18):

Además, la química para preparar estos compuestos es sencilla con un buen rendimiento, implicando la reacción de un cloruro de sulfonilo con una anilina/amina, que se puede obtener comercialmente o sintetizar fácilmente.

EXP IA. Modificación 1. Dado que casi todas las sondas de 2ª generación contienen un grupo fenilsulfonilo, el primer paso hacia la optimización de la actividad se centra en sintetizar una serie de compuestos que tienen un grupo mayor (por ejemplo, bicíclico o tricíclico) o un grupo alquil sulfonilo. La ruta de síntesis general se muestra de la siguiente manera:

Existen aproximadamente 4,300 cloruros de sulfonilo comercialmente disponibles, entre los cuales 25, tales como los mostrados anteriormente, se seleccionan para fabricar sondas. La anilina 2, que es el componente amina del compuesto 188-10 (figura 16), una de las sondas más activas, se prepara fácilmente en una simple reacción en dos etapas a partir del compuesto nitro 1. Se pueden preparar primero 25 (por ejemplo) compuestos y ensayar sus actividades en un ensayo SPR de rendimiento rápido in vitro y ensayos de HTFM in vivo (descritos más adelante). Basándose en los resultados del estudio de la relación estructura-actividad, se pueden diseñar y sintetizar más compuestos y ensayarlos de forma iterativa hasta la optimización de esta modificación.

EXP IB. Modificación 2. A continuación, se puede modificar el sustituyente en 3 del anillo de naftilamina, basado en ya sea la estructura del compuesto 188-15 (actualmente la sonda más potente) o en que el nuevo grupo sulfonilo más activo emergió del estudio de la modificación 1 anterior. Estudios SAR previos demostraron que este sustituyente es útil para la actividad de esta clase de sondas, en ciertos casos. Sin embargo, un total de 8 grupos en esta posición con una enorme diferencia de tamaño, desde un solo átomo de Cl a un grupo bicíclico benzotiazol-2-ilmercapto, grande mostró actividades similares. Esta característica indica que en ciertos casos las modificaciones en esta posición deberían estar más enfocadas en otras propiedades, tales como las interacciones electrostáticas con la proteína, como se ejemplifica a continuación. Además, muchos de estos grupos son tioéteres, que pueden ser sometidos a oxidación/degradación in vivo y dar lugar a un perfil farmacocinético desfavorable, en aspectos particulares. El átomo S central se cambia a isómeros más estables metabólicamente, tales como -CH₂-, -NH- y -O-, en ciertos casos. En ciertos aspectos se pueden sintetizar los siguientes compuestos para optimizar el sustituyente 3:

La síntesis también se inicia a partir de 1, en ciertos casos. La halogenación y formilación regioselectiva en la posición 3 da lugar a dos compuestos, esto es, el compuesto 3 bromo- o yodo- y el aldehído 4, que son versátiles, compuestos de partida comunes para introducir un amplio intervalo de sustituyentes en esta posición (por ejemplo, los enumerados anteriormente).

Además, la estructura cristalina del dominio SH2 de Stat3 también proporciona una fuerte evidencia de que más compuestos con diferentes propiedades electrostáticas son útiles para la caracterización. La superficie molecular electrostática de la proteína muestra dos características distintas, como se muestra en la figura 19. La primera es la superficie roja, negativamente cargada Glu638 se destaca en el centro. A continuación, de particular interés es una zona cargada positivamente (en azul en una versión en color), compuesta de Arg609 y Lys591 situada en el borde del dominio, que es realmente el sitio de unión pY (tirosina fosforilada) del receptor. Los inventores también encontraron que la introducción de un grupo cargado negativamente dirigido al sitio de unión pY conduce a sondas particularmente

activas, en ciertos casos. Por ejemplo, el estudio de acoplamiento del compuesto 5 3-fosfometilo ($R = \text{CH}_2\text{PO}_3^{2-}$) mostró que todos los grupos fosfonatos de las 20 poses de acoplamiento se agrupan fuertemente y se localizan en el sitio de unión pY, indicando fuertes interacciones electrostáticas y enlaces H con los residuos Arg609 y Lys591 (figura 19).

5 EXP IC. Modificaciones 3 y 4. Colectivamente, las modificaciones 3 y 4 prueban los efectos de cambiar los sustituyentes en las posiciones 4, 5 y 6. El -OH en la posición 4 es superior a -OR, en ciertos aspectos. Se puede comprobar si el átomo de H en -OH es responsable de una mejor actividad sintetizando los compuestos 6 (acilados o alquilados 5), como se muestra esquemáticamente a continuación. Además, también se preparan compuestos 7 deshidroxi, a partir de 3-bromonafil-1-amina.

10 A continuación, los métodos de síntesis generales para modificar las posiciones 5 y 6 se muestran abajo. Se puede sintetizar primero aproximadamente una docena de estos compuestos en esta categoría y si surgen compuestos muy activos, se pueden hacer más compuestos para optimizar la actividad para estas dos posiciones.

EXP ID. Modificación 5. Los dos únicos compuestos no incluidos en el análisis SAR (debido a un sustituyente 4 diferente) se muestran en este documento, así como sus actividades inhibitoras contra Stat3:

15 A pesar de la actividad débil, enmascarar el H polar de la sulfamida para el segundo compuesto es favorable, en ciertos aspectos, que proporciona una ruta fácil para hacer sondas más potentes. Por lo tanto, se puede utilizar el siguiente método para preparar una serie de N-acil o N-alquilsulfamidas 5:

Ejemplo 12

Identificación de sondas químicas selectivas de stat3 a partir de compuestos de sulfamida sintetizados en el ejemplo 11

20 Se ensaya cada nuevo compuesto de sulfamida para determinar la capacidad para inhibir la unión de Stat3 a su ligando fosfopeptídico por SPR y la capacidad de bloquear la translocación del citoplasma al núcleo estimulada por IL-6 en el ensayo de HTFM. Las sondas con actividad en estos ensayos equivalentes o superiores a los compuestos de 2ª generación más activos se ensayan para determinar la inhibición de la fosforilación de Stat3 estimulada por IL-6 y la falta de capacidad para inhibir la fosforilación de Stat1 estimulada por IFN- γ como se describe a continuación.

25 EXP IIA. Ensayo de inhibición de unión SPR de Stat3/péptido pY. Los ensayos de unión del péptido pY Stat3 se realizan a 25°C usando un biosensor BIAcore 3000 como se describe (Xu et al., 2009). En resumen, los dodecapéptidos derivados de EGFR no fosforilados y control no fosforilados basados en la secuencia que rodea a Y1068 se inmovilizan en un chip del sensor recubierto con estreptavidina (BIAcore Inc., Piscataway NJ). La unión de Stat3 se realiza en solución reguladora Tris 20 mM pH 8 que contiene β -mercaptoetanol 2 mM a una velocidad de flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 1-2 minutos. Alícuotas de Stat3 a 500 nM se premezclan con el compuesto para alcanzar una concentración final de 1-1,000 μM y se incuban a 4°C antes de ser inyectadas sobre el chip sensor. El chip se regenera inyectando 10 μL de glicina 100 mM a pH 1.5 después de cada inyección de muestra. Un control (Stat3 con DMSO, pero sin compuesto) se realiza al principio y al final de cada ciclo (40 inyecciones de muestra) para asegurar que la integridad del chip sensor se mantiene a lo largo del análisis del ciclo. El promedio de los dos controles se normaliza al 100% y se usa para evaluar el efecto de cada compuesto sobre la unión de Stat3. Las respuestas se normalizan dividiendo el valor a 2 min por la respuesta obtenida en ausencia de compuestos a 2 min y multiplicando por 100. Los valores de IC_{50} se determinan realizando un gráfico del % de respuesta máxima en función de la concentración log del compuesto y ajustando los puntos experimentales a un modelo de unión competitiva usando una ecuación logística de cuatro parámetros: $R = R_{\text{alto}} - (R_{\text{alto}} - R_{\text{bajo}}) / (1 + \text{conc}/A1)^{A2}$, donde R = porcentaje de respuesta a la concentración del inhibidor, R_{alto} = porcentaje de respuesta sin compuesto, R_{bajo} = porcentaje de respuesta a la concentración del compuesto más alta, $A2$ = parámetro de ajuste (pendiente) y $A1 = \text{IC}_{50}$ (BIAevaluation Software versión 4.1).

30

35

40

45 EXP IIB. Microscopía de fluorescencia de alto rendimiento (HTFM), ensayos de inhibición de la translocación de citoplasma a núcleo. HTFM de células MEF/GFP-Stat3 α se realiza para evaluar la capacidad de las sondas para inhibir la translocación citoplasma a núcleo GFP-Stat3, como se describe (Xu et al., 2009), usando el sistema robótico disponible como parte de the John S. Dunn Gulf Coast Consortium for Chemical Genomics at the University of Texas-Houston School of Medicine. En resumen, las células se sembraron en placas CC3 de 96 pozos a una densidad de 5,000 células/pozo y se cultivaron en condiciones estándar hasta 85-90% de confluencia. Las células se trataron previamente con el compuesto durante 1 hora a 37°C, luego se estimularon con IL-6 (100 ng/ml) e IL-6sR (150 ng/ml) durante 30 minutos. Las células se fijaron con formaldehído al 4% en solución reguladora PEM (PIPES de potasio 80 mM, pH 6.8, EGTA 5 mM pH 7.0, MgCl_2 2 mM) durante 30 minutos a 4°C, se inactivaron en 1 mg/ml de NaBH_4 (Sigma) en solución reguladora PEM y se contratiñeron durante 1 min en 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI Sigma, 1 mg/ml) en solución reguladora PEM. Las placas se analizan mediante HTFM automatizado usando la plataforma Cell Lab IC Image Cytometer (IC100) y el software de análisis CytoshopVersion 2.1 (Beckman Coulter).

50

La translocación nuclear se cuantifica usando la medición de la fracción localizada en el núcleo (FLIN). Los valores FLIN se normalizan restando el FLIN para las células no estimuladas, a continuación, dividiendo esta diferencia por la diferencia máxima (Δ) en FLIN (FLIN en células estimuladas con IL-6/sIL-6R en ausencia de compuesto menos FLIN de células no estimuladas). Esta proporción se multiplica por 100 para obtener el porcentaje de diferencia máxima en FLIN y se representa en función de la concentración log del compuesto. La curva de ajuste óptimo y el valor de IC_{50} se determinan mediante el software IDBS, 4-Parameter Logistic Model/Dose Response/XLfit 4.2.

EXP IIC. Ensayos de inhibición pStat3 y pStat1 mediados por ligandos. Las sondas de Stat3 recién sintetizadas con una actividad equivalente o superior al compuesto original 188 en los ensayos SPR y HTFM serán ensayadas para determinar la capacidad para inhibir selectivamente la fosforilación mediada por ligando de Stat3 como se describe (Xu et al., 2009). En resumen, las células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) se cultivan en placas de 6 pozos y se trataron previamente con los compuestos (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μ M) durante 1 hora, luego se estimulan en condiciones óptimas con ya sea interleucina-6 (IL-6, 30 ng/ml durante 30 min) para activar Stat3 o interferón gamma (IFN- γ ; 30 ng/ml durante 30 min) para activar Stat1. Se recogen las células y se extraen las proteínas usando solución reguladora de alto contenido en sal, se mezclan con solución reguladora de muestra de dodecilsulfato de sodio 2X (SDS) (125 mmol/L de Tris-HCL pH 6.8, SDS al 4%, glicerol al 20% y 2-mercaptoetanol al 10%) a una proporción 1:1 después se calentó durante 5 minutos a 100°C. Las proteínas (20 μ g) se separan por SDS-PAGE al 7.5% y se transfieren a membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore, Waltham, MA) y fueron inmunotransferidas. Las membranas son probadas en serie con el anticuerpo contra Stat1 pY701 o Stat3 pY705 seguido de anticuerpo contra Stat1 o Stat3 (Transduction labs, Lexington, KY), luego anticuerpo contra β -actina (Abcam, Cambridge, MA). Las membranas se retiran entre los análisis de anticuerpos usando la solución reguladora de RestoreTM Western Blot Stripping (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) según las instrucciones del fabricante. La IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante se utiliza como anticuerpo secundario (Invitrogen Carlsbad, CA) y las membranas se desarrollan con un sistema de detección de quimioluminiscencia (ECL) mejorado (Amersham Life Sciences Inc., Arlington Heights, IL). Las intensidades de banda se cuantifican por densitometría. El valor de cada banda de pStat3 se divide por su correspondiente intensidad de banda de Stat3 total; los resultados se normalizan con el valor de control tratado con DMSO. Este valor se representó como una función de la concentración log del compuesto. La curva de ajuste óptimo se determina usando el software IDBS, 4-Parameter Logistic Model/Dose Response/XLfit 4.2 y se usó para calcular el valor de IC_{50} .

EXP IID. Modelado molecular de las interacciones sonda-Stat3. Los resultados del modelado de la unión de la sonda de primera generación para los dominios SH2 de Stat3 frente a Stat1 sugirieron que la base para la selectividad experimental de las sondas de Stat3 frente a Stat1 se basa en la capacidad de las sondas para tener una mayor interacción con el sitio de unión hidrófobo en el bolsillo de unión del péptido pY de Stat3 en comparación con Stat1. De este modo, el sitio de unión hidrófobo sirvió como un filtro de selectividad. Para probar si este sigue siendo el caso para sondas de 3^a generación sintetizadas recientemente, se pueden usar 2 programas de acoplamiento complementarios GLIDE (Schrödinger) e ICM (MolSoft) para determinar la configuración de acoplamiento de energía más baja de cada sonda dentro del dominio de unión del péptido pY de dominio SH2 de Stat3 y Stat1. Se pueden revisar los modelos computacionales de cada sonda en un complejo con el dominio Stat3 frente a SH2 de Stat1 y, en particular, comparar las energías de van der Waals y determinar si son equivalentes para su interacción con el dominio SH2 de Stat3 frente a Stat1. Este cálculo fue el que determinó la selectividad de las sondas de 1^a generación para Stat3 frente a Stat1. En particular, los cálculos de energía de van der Waals implicaron residuos críticos para esta selectividad que forman el sitio de unión hidrófobo (W623, Q635, V637, Y640 y Y657).

En casos específicos, hay identificación de sondas con un log o mayor actividad que las sondas de 2^a generación en ensayos SPR, HTFM y pStat3. Adicionalmente, en algunos aspectos, algunas de las sondas de 3^a generación más activas que emergen de este análisis son selectivas para Stat3 frente a Stat1 basándose en su mayor interacción con el sitio de unión hidrófobo dentro del bolsillo de unión del péptido pY SH2 de Stat3 frente a Stat1. Las sondas más activas y selectivas se examinan para determinar su efecto sobre la biología de células madre hematopoyéticas normales y células madre leucémicas como se indica en el ejemplo 13 a continuación y sobre células madre cancerosas de mama como se indica en el ejemplo 16.

Ejemplo 13

Examen de las sondas químicas stat3 de 3^a generación candidatas para el direccionamiento selectivo de células madre leucémicas mieloides, mientras que se preservan las células madre/progenitoras hematopoyéticas

Se examinan sondas de tercera generación con actividad mayor que la sonda de 2^a generación más activa, así como las sondas de 2^a generación más activas, para determinar sus efectos sobre las células madre/progenitoras mieloides leucémicas y normales de ejemplo usando ensayos de unidad formadora de colonias macrófago/granulocito de leucemia y normal (CFU-GM). Se pueden identificar sondas de Stat3 que preservan las células madre/progenitoras normales en este ensayo mientras que se dirigen a células madre leucémicas. El ensayo CFU-GM normal tarda una semana en realizarse, mientras que el ensayo CFU-GM de leucemia del ensayo de trasplante/transducción retroviral

(RTTA) toma 3 semanas. Por consiguiente, se puede primero cribar cada sonda de Stat3 candidata en el ensayo CFU-GM normal. Aquellas sondas sin actividad en el ensayo CFU-GM normal son entonces ensayadas en el RTTA.

5 EXP IIIA. Cribado de sondas para la actividad contra células madre/progenitoras hematopoyéticas normales en el ensayo CFU-GM. Las células de médula ósea murina se recogen y procesan, como se ha descrito anteriormente (Tweardy et al., 1991) con las siguientes modificaciones (figura 20). En resumen, las células madre hematopoyéticas seleccionadas de c-kit (HSC) se siembran a $2-5 \times 10^4$ células por placa en metilcelulosa que contiene factor de células madre (SCF), IL-3, IL-6 y GM-CSF. Estos HSC se tratan con o sin sondas de Stat3. A los 7 días, se evalúan las placas para ver si estos compuestos tienen algún efecto sobre la hematopoyesis normal según se evaluó por número de colonias, morfología, antígenos de superficie celular examinados por FACS usando anticuerpos tales como CD11b, Gr-1 y B220, Q-RT-PCR y Western blot.

15 EXP IIIB. Ensayo de sondas de Stat3 para determinar la actividad contra células madre leucémicas en el ensayo RTTA. Los inventores han construido vectores basados en pMSCV que contienen cada uno un miembro de uno de los grupos principales de proteínas de fusión quiméricas que se producen en AML incluyendo aquellos que implican genes RAR γ y genes AML1 (figura 21). Se ha demostrado que los miembros del primer grupo, en particular, han demostrado que está implicado en interacciones con la vía de señalización de Stat3 (Dong and Tweardy, 2002, Dong et al., 2003).

20 Cada construcción se examina para determinar su capacidad para transformar células progenitor/madre de médula ósea normales en el RTTA (figura 22). En resumen, se producen sobrenadantes retrovirales pseudotipados mediante transfección transitoria de células de empaquetamiento de Phoenix con construcciones retrovirales de virus de células madre murinas (MSCV) que contienen una proteína de fusión de leucemia. Los sobrenadantes virales se utilizarán para infectar progenitores hematopoyéticos murinos de ratones de C57BL/6 de tipo salvaje de 4 a 10 semanas purificados que han sido seleccionados positivamente para la expresión de c-kit por clasificación celular activada magnéticamente (MACS). Después de la espinoculación, las células transducidas se siembran en placa en metilcelulosa al 1% suplementada con factor de células madre (SCF), IL-3, IL-6 y GM-CSF en presencia o ausencia de G418 o puromicina. Las colonias resistentes a G418 o puromicina se vuelven a sembrar en placa dos veces en el mismo medio de metilcelulosa condicionado después de 7 días de cultivo.

30 Las células transducidas con el vector de control agotan su capacidad proliferativa en la segunda ronda de siembra en placas, mientras que las células inmortalizadas por las oncoproteínas de leucemia mantienen su capacidad de volver a sembrar en placas y son capaces de expandirse en cultivo líquido (véase la figura 23). La siembra en placas se repite cada 7 días. Para los estudios de cribado de fármacos, las células transducidas se recogen después de la segunda siembra en placa y se dividen uniformemente en un número suficiente de placas para ensayar la sonda de Stat3 en un intervalo de concentración de 0.1-10 μM en incrementos de concentración de medio log. Después de 7 días de incubación, se pueden examinar placas para el efecto de las sondas sobre el número de colonias, morfología y para la expresión de antígenos de superficie relevantes, ARNm y proteína.

35 Para construcciones en las que las sondas de Stat3 inhiben la formación de colonias leucémicas, se puede confirmar que el efecto de la sonda de Stat3 se debe al efecto sobre Stat3 y no a un efecto diana desactivado al probar el efecto de la formación de colonias de células madre leucémicas de cotransfección de células c-kit+ con la construcción pMSCV-neo/proteína de fusión y pSuperpuro/ARNhc-mStat3. Se diseñan construcciones, murina(m) Stat3 ARNhc, como se describe (Ling and Arlinghaus, 2005), y se usan en experimentos de cotransfección con RTTA, como se describe (Zeisig et al., 2007).

40 Los inventores obtuvieron resultados útiles que probaron la primera de las sondas químicas de Stat3 de 2ª generación, Com188-9, para determinar la capacidad para inhibir el número de colonias CFU-GM leucémicas y normales. Com188-9 no mostró ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de colonias CFU-GM normales hasta una concentración de 100 μM (figura 24). En contraste, inhibió la formación de colonia de células madre leucémicas en el RTTA con una EC50 de $\sim 5 \mu\text{M}$ (figura 25).

45 Ejemplo 14

Descripción general de las realizaciones de cáncer de mama de la invención

50 El cáncer de mama es el cáncer femenino más común en los Estados Unidos, la segunda causa más común de muerte por cáncer en mujeres (después del cáncer de pulmón), y la principal causa de muerte en mujeres de 45 a 55 años. Los datos del programa Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) del National Cancer Institute indican que la probabilidad de desarrollar cáncer de mama en toda la vida es de uno en seis; para el cáncer de mama invasivo, la probabilidad es de uno en nueve. Si bien los datos recientes del programa SEER sugieren que la incidencia de cáncer de mama de receptor de estrógeno (ER) y/o progesterona (PgR) negativo está disminuyendo en relación con la enfermedad ER/PgR-positivo (Li et al., 2003), opciones de tratamiento para enfermedad ER/PgR negativo tienen una mayor toxicidad y los resultados son mucho más pobres que para la enfermedad ER/PgR positivo, lo que subraya la

necesidad urgente de nuevas terapias para este subconjunto de cánceres. Además, cada año, ~ 40,000 mujeres solo en los Estados Unidos sufrirán una recaída de cáncer de mama, y la mayoría de esta morirán de su enfermedad (Jemal et al., 2006). Ha habido pocos cambios en la supervivencia general de las mujeres con cáncer de mama metastásico en las últimas décadas (Minino et al., 2007), a pesar de todos los avances significativos en la biología del cáncer de mama y la multitud de ensayos clínicos que se han realizado.

Células madre cancerosas de mama. Las quimioterapias convencionales son inicialmente eficaces para controlar el crecimiento de muchos tumores. Sin embargo, muchos pacientes recurren con el tiempo a pesar de responder inicialmente. Una posible explicación es que una rara subpoblación de células con potencial tumorigénico es intrínsecamente resistente al tratamiento. Esta hipótesis proporciona una explicación unificada para el éxito y los fracasos de la quimioterapia citotóxica-a saber, aunque la mayoría de las células en el tumor original pueden ser aniquiladas, la diana más importante, se preserva una pequeña población de células cancerosas resistentes a la terapia que poseen capacidad de iniciar un tumor (células madre cancerosas), evitando así otra vez el crecimiento del tumor. Las investigaciones recientes por parte de los inventores y otros han proporcionado un fuerte apoyo a la "hipótesis de la célula madre cancerosa (CSC)", que proporciona un mecanismo para la resistencia a los tratamientos convencionales, así como una posible explicación de la recaída y las metástasis. La hipótesis CSC es un modelo fundamentalmente diferente en el que los tumores contienen una subpoblación que conserva las principales propiedades de las células madre, incluida la autorenovación, que inicia y conduce la carcinogénesis y la diferenciación que contribuye a la heterogeneidad celular. Aunque el concepto de que los cánceres surgen de tanto las células germinales o células madre se propuso hace más de 150 años (Fiala, 1968), es sólo recientemente que los avances en la biología de células madre han permitido la prueba directa de la hipótesis CSC. Recientemente, estos conceptos se extendieron a tumores sólidos por algunos grupos demostrando que los cánceres de mama humano fueron impulsados por un "componente de células madre cancerosas" caracterizado por el fenotipo CD44+/CD24-/baja (Al-Hajj et al., 2003). Los inventores han completado recientemente un ensayo clínico de cáncer de mama neoadyuvante, que proporciona una fuerte evidencia clínica para la resistencia de CSC a la quimioterapia. Demostraron un aumento de tres veces en la proporción de CD44+/CD24-/baja CSC después de la quimioterapia en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado. De modo interesante, el inhibidor de la tirosina quinasa EGFR/HER2 lapatinib condujo a una disminución en la proporción de CSC (Strecker et al., 2009). Este estudio indicó que las CSC son relativamente resistentes a la quimioterapia, pero que están afectadas por el inhibidor de EGFR/HER2 lapatinib (Strecker et al., 2009). Consistente con esto, se ha demostrado por primera vez clínicamente en pacientes con cáncer de mama humano que los tumores residuales después de la quimioterapia son 1) enriquecidos para la población CD44+/CD24-/baja tumorigénica, 2) muestran una mayor eficacia de formación de la mamófera (MSFE), y 3) muestran un aumento en la excrecencia en trasplantes de xenoinjerto en ratones SCID/Beige inmunocomprometidos, sugiriendo de este modo su aumento de tumorigenicidad (Li et al." 2008; Dave and Chang, 2009).

Direccionamiento de células madre cancerosas. Ambos estudios preclínicos y clínicos apoyan la hipótesis de que las CSC contribuyen a la resistencia y a la recaída del tratamiento. De este modo, las terapias más eficaces requerirán el direccionamiento selectivo de esta población celular crucial. A partir de biopsias obtenidas de mujeres con cáncer de mama primario, los inventores han identificado una "firma de células madre cancerosas", con vías reguladoras clave, como Notch, PI3-AKT y Stat3 y otras, que pueden ser responsables de la autorenovación de células madre cancerosas, y, por lo tanto, a la resistencia y la recaída del tratamiento.

Cáncer de mama y Stat3. Informes recientes indican que hay un aumento de la activación de Stat3 en muestras de cáncer de mama invasivos de ER-negativo y en líneas de células metastásicas de ER-negativo. El aumento de la activación de Stat3 dentro de estos tejidos y células cancerosas produce niveles incrementados de proteínas antiapoptóticas incluyendo Bcl-2 y Survivin (Diaz et al." 2006; Gritsko et al." 2006; Real et al." 2002). Además de favorecer la expresión de proteínas antiapoptóticas, aumento de la actividad de Stat3 contribuye a la oncogénesis en el cáncer de mama y otros sistemas de cáncer a través de varias vías adicionales, incluyendo la mejora de la proliferación celular, la inducción de la angiogénesis y la supresión de las respuestas inmunes (Yu and Jove, 2004), haciendo a Stat3 una diana de rendimiento potencialmente alto para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de muchos cánceres, pero en particular para el tratamiento del cáncer de mama ER-negativo y HER2/Neu-negativo para el que actualmente existen pocas terapias eficaces y virtualmente no tóxicas. Adicionalmente, los inventores han determinado a partir del conjunto de datos más grande del análisis de expresión génica de la población de CD44 +/CD24/baja-MS que las vías canónicas principales implicadas en la autorenovación de células madre incluyen señalización de Stat3.

En ciertos aspectos de la invención, Stat3 es indispensable para la función de las células madre cancerosas de mama y puede ser inhibido con moléculas pequeñas que se dirigen a su dominio SH2 dirigiéndose así eficazmente a las células madre cancerosas de mama.

En un cierto caso, se desarrollan sondas de Stat3 de tercera (3ª) generación con mayor actividad inhibitora realizando química medicinal. Las sondas de tercera generación se desarrollan con una mayor actividad contra Stat3 basándose en modificaciones estructurales de la sonda de 2ª generación más activa, por ejemplo. En un caso, se puede usar la sonda de 2ª generación más activa, Com188-15, por ejemplo, como un andamio para hacer sondas de 3ª generación.

Las modificaciones se pueden basar en los resultados de un análisis de ejemplo de relación estructura-actividad (SAR) realizado en sondas de 2ª generación y centrarse alrededor de la síntesis directa de sulfamidas a partir de paneles de cloruros y amidas de sulfonilo. Cada nuevo compuesto de sulfamida se examina en un ensayo de SPR de rendimiento rápido para determinar la capacidad para inhibir la unión de Stat3 a su ligando fosfopeptídico seguido de microscopía de fluorescencia de alto rendimiento (HTFM) que examina la inhibición de la translocación del citoplasma al núcleo estimulada por IL-6. Las sondas más activas en estos ensayos se examinan para determinar su selectividad para Stat3 frente a Stat1 mediante la prueba de inhibición de la fosforilación de Stat3 estimulada con IL-6 y por no inhibir la fosforilación de Stat1 estimulada con IFN- γ .

En otro caso, se determina si la supresión de la vía Stat3 puede mejorar las terapias contra el cáncer existentes en modelos de xenoinjerto humano y eficiencia de la formación de mamófera preclínica (MSFE). En una realización específica, las células madre cancerosas de mama se eliminan con sondas específicas que se dirigen a Stat3. Usando la sonda más activa desarrollada como se ha descrito anteriormente, se puede determinar si la inhibición de Stat3 por estos compuestos de 3ª generación mejora la eficacia de la terapia convencional in vitro e in vivo, usando modelos de xenoinjerto de cáncer de mama humano y MSFE.

15 Ejemplo 15

Inhibidores de STAT3 para el cáncer de mama humano

Enriquecimiento de células madre cancerosas en tumores residuales después de terapia neoadyuvante. Los inventores aislaron CSC marcadas con CD44+/CD24-/^{baja} de biopsias de núcleo de cáncer de mama emparejadas obtenidas de pacientes de cáncer de mama primario antes y después de la quimioterapia (n = 31). La quimioterapia condujo a un aumento en el porcentaje de células CD44+/CD24-/^{bajas} (media en la línea basal frente a 12 semanas, 4.7% frente a 13.6%, P < 0.001) y un aumento de la capacidad de autorenovación en los ensayos MSFE (P < (Li et al." 2008; Dave and Chang, 2009), por lo tanto, los tumores residuales después de la terapia convencional se enriquecen de células madre cancerosas (CSC).

Modelos preclínicos. Existen modelos preclínicos robustos que utilizan ambos sistemas in vitro (MSFE), así como xenoinjertos tumorales (Strecker et al." 2009; Li et al." 2008) para elucidar las vías moleculares de regulación de las células madre cancerosas que han llevado al desarrollo de nuevos agentes para dirigir estas células. A partir de biopsias de cánceres de mama primario, los inventores han establecido trece xenoinjertos primarios. De estos, los inventores han trasplantado con éxito diez diferentes cánceres de mama humano en xenoinjertos terciarios. Los patrones de expresión génica de los xenoinjertos primarios y terciarios fueron similares, proporcionando de este modo una fuente renovable de cáncer de mama humano, cada uno de los cuales es genotípicamente estable.

Patrones de transcripción de genes en células cancerosas de mama con potencial tumorigénico. Los inventores razonaron que las características de perfil de expresión en común entre CD44+/CD24-/^{baja} frente a todas las otras subpoblaciones de células, y MS derivado de cáncer frente a tumor en masa sería más probable que representen el inicio del tumor o "células madre cancerosas". Entre los dos conjuntos de genes, 477 genes fueron comunes, con 185 de estos expresados más altamente en células CD44+/CD24-/^{baja} y en MS, un traslape altamente significativo (p < 1.0E-9, unilateral de exacta de Fisher). Además, había 292 genes cuya expresión era menor en células CD44+/CD24-/^{bajas} y MS derivadas del cáncer frente a todas las demás células y tumores a granel, respectivamente. Una vez más, este grado de traslape fue altamente estadísticamente significativo (p < 5.0E-5, unilateral de exacta de Fisher). En el análisis de la vía Ingenito, la firma compartida por las células quimiorresistentes CD44+/CD24-/^{baja} y MS derivadas del cáncer mostró expresión diferencial de genes relacionados con las vías Notch, PI3-AKT y Stat3. De los estudios iniciales, Stat3 es el principal candidato responsable de la autorenovación de las células madre cancerosas.

Desarrollo de sondas de Stat3 de primera generación. Para desarrollar sondas químicas que se dirigen selectivamente a Stat3, los inventores cribaron virtualmente 920,000 pequeños compuestos similares a fármacos acoplado cada uno de ellos al bolsillo de unión del péptido del dominio SH2 de Stat3, que consta de tres sitios: 1) el sitio de unión del residuo pY, conservado dentro de todos los dominios SH2 (sitio de unión general, GBS), 2) el sitio de unión del residuo +3 específico para unión de Stat3 a su dominio péptido pY (sitio de unión específico, SBS) y 3) un sitio de unión hidrófobo (HBS), que sirvió como filtro de selectividad. Tres compuestos (Com3 (no reivindicado), Com30 y Com188) satisfacen los criterios de análisis de interacción, inhiben competitivamente la unión de Stat3 recombinante a su ligando del péptido pY inmovilizado e inhiben la fosforilación de tirosina mediada por IL-6 de Stat3. Estos compuestos se usaron en una criba de similitud de 2.47 millones de compuestos, los cuales identificaron 3 compuestos más (Com3-2 (no reivindicado), Com3-7 (no reivindicado) y Com30-12) con actividades similares. El examen de los seis compuestos activos para determinar la capacidad para inhibir la fosforilación de Stat1 mediada por IFN- γ reveló que todos excepto Com30-12 fue selectivo para Stat3. El modelado molecular de los dominios SH2 de Stat3 y Stat1 unidos al compuesto reveló que la interacción del compuesto con el sitio de unión hidrófobo era la base para la selectividad. Los 5 compuestos selectivos inhibieron la translocación de núcleo a citoplasma de Stat3, mientras que 3 de 5 compuestos (Com3 (no reivindicado), Com30 y Com188) indujeron la apoptosis preferencialmente de líneas celulares de cáncer de mama con la activación

5 constitutiva de Stat3. De este modo, el cribado virtual de ligandos de bibliotecas de compuestos que se dirigían al bolsillo de unión del péptido pY de Stat3 identificó por primera vez tres compuestos de plomo que inhibían competitivamente la unión de Stat3 a su ligando del péptido pY; estos compuestos fueron selectivos para Stat3 frente a Stat1 e indujeron apoptosis preferencialmente de líneas celulares de cáncer de mama con Stat3 activado constitutivamente (Xu et al." 2009).

10 El inhibidor de Stat3 (Com188) de primera generación en el xenoinjerto de cáncer de mama humano reduce significativamente MSFE. Se realizó un estudio piloto inicial para determinar si Com188 disminuiría MSFE. Se trasplantó una línea tumoral derivada de una muestra de biopsia de cáncer de mama humano "triple negativa" (ER-negativo, PgR-negativo y HER-2 negativo) en ratones SCID Beige inmunocomprometidos. Los animales (n = 3) recibieron dos dosis de vehículo control, 2 dosis diferentes del Com 188 (125 o 250 mcg), un oligodesoxinucleótido de cuarteto G (GQ-ODN, T40214; GQ-I) previamente determinado para dirigir Stat3 (Jing et al." 2004) y un ODN de control no específico (GQ-II) cada uno a dos dosis (125 o 250 mcg). Los animales se sacrificaron después de sólo dos días de tratamiento, y se determinó MSFE. Desde estos estudios a corto plazo, Com 188 (250 mcg) y T40214 (GQ-1; 125 y 250 mcg) mostraron una reducción significativa en el MSFE comparado con el control (P <0.05, figura 26). Basándose en estos resultados
15 iniciales, los inventores han llevado a cabo experimentos a gran escala usando al menos dos modelos de tumor de xenoinjerto, para demostrar que Com188 y el principal inhibidor de 2ª generación (Com188-15, véase más adelante) mejoran las terapias contra el cáncer existentes disminuyendo el volumen tumoral y disminuyendo MSFE.

Ejemplo 16

Supresión de la vía de stat3 y terapias contra el cáncer

20 En una realización de la invención, se determina que la supresión de la vía Stat3 mejora las terapias contra el cáncer existentes en modelos preclínicos de xenoinjerto de cáncer de mama humano y de MSFE, por ejemplo.

25 Se puede determinar que la inhibición de Stat3 mejora la eficacia de la terapia convencional usando modelos de xenoinjerto de cáncer de mama humano y MSFE. En una realización específica, las CSC se pueden eliminar con inhibidores específicos que se dirigen a Stat3. En los estudios iniciales, un inhibidor de Stat3 de segunda generación (CMP188-15) afecta a la autorenovación medida por MSFE. Basándose en los estudios iniciales, se puede determinar si estos inhibidores de Stat3 de 2ª y 3ª generación mejoran la eficacia de la quimioterapia convencional. Estos estudios implican análisis in vitro de la activación de la vía, así como modelos de células madre de xenoinjerto tumoral desarrollados por los inventores. Se puede caracterizar el papel de Stat3 en la regulación de autorenovación y supervivencia de células madre cancerosas de mama.

30 En ciertas realizaciones, la actividad de las sondas de Stat3 de 3ª generación de plomo se determinan en ensayos de inhibición de MSFE y ensayos de inhibición de xenoinjertos.

35 Ensayos de tratamiento de MS. Utilizando las MS secundarias creadas a partir de muestras de cáncer de mama humano, se puede probar una gama de ~ cincuenta inhibidores de Stat3 de 3ª generación frente a controles sin tratamiento. Se usan MS secundarias creadas a partir de biopsias de cáncer de mama humano, como se describe en otra parte de esta memoria descriptiva. Estas MS secundarias se hacen crecer hasta un diámetro de 50-100 µm y se tratan con control o inhibidor. Las células cancerosas residuales después del tratamiento se disocian a células individuales por tripsinización breve y las células se vuelven a sembrar en placas. La formación de MS terciaria refleja la proporción de células iniciadoras de MS que sobrevivieron al tratamiento, que podría por lo tanto quedar vivas para reiniciar el crecimiento del tumor. Los valores de MSFE son log transformados y se comparan usando una prueba t. A
40 partir de estos ensayos de MSFE, los 5 inhibidores superiores (por ejemplo) se ensayan en estudios de xenoinjertos, como se describe a continuación.

45 Ensayos de xenoinjerto. Se pueden usar dos xenoinjertos desarrollados a partir de biopsias de cáncer de mama humano que expresan p-Stat3 activado por IHC. A partir de estas líneas de xenoinjerto establecidas, para cada uno de los 5 inhibidores superiores, se pueden realizar los siguientes estudios: a) experimentos a corto plazo con inhibidores de células madre a dos dosis frente a vehículo control y b) la dosis óptima de combinación de quimioterapia con cada uno de los cinco inhibidores de células madre.

50 a) Experimentos a corto plazo (2 días): Se pueden probar los cinco inhibidores a 2 dosis. En estos estudios iniciales, se pueden analizar xenoinjertos seleccionados (3 ratones por xenoinjerto x 2 xenoinjertos x 5 inhibidores de autorenovación a dos dosis + 1 grupo de control sin tratar) para: 1) confirmar que se ha inhibido la vía de diana, y 2) medir cualquier cambio en los marcadores de las poblaciones de células madre por MSFE.

b) Experimentos a largo plazo (estudios de 2 semanas): Se puede evaluar el efecto del inhibidor de autorenovación sobre el crecimiento tumoral y el comportamiento de las células madre. Se ensayan ocho ratones para cada una de las dos líneas de xenoinjerto por tratamiento. Los animales reciben dos trasplantes, uno en cada almohadilla de grasa

5 mamaria # 4 (8 ratones/xenoinjerto/tratamiento con 5 grupos de tratamiento + un control no tratado = 32 ratones por xenoinjerto). Cuando los tumores de xenoinjerto alcanzan un promedio de 5 mm de diámetro, un tumor de un lado del animal (seleccionado al azar) se elimina quirúrgicamente para servir como control de pretratamiento. Después de una semana de recuperación, el ratón se asigna aleatoriamente a un docetaxel, inhibidor, inhibidor + docetaxel frente a control. Los animales se sacrifican después de dos semanas, dando conjuntos de muestras emparejadas antes y después del tratamiento para cada fármaco y dosis. El tamaño de los xenoinjertos se monitorea longitudinalmente mediante la medición del calibre usando los criterios RECIST para la evaluación de la respuesta del tumor. Los resultados del estudio incluyen el tamaño del tumor en la cosecha/sacrificio, pre- frente a post-tratamiento % CD44+/CD24-, y pre- frente a post-tratamiento MSFE. Este experimento permite escoger, para cada xenoinjerto, un fármaco y una dosis que reduce los tumores y aumenta las células autorenovadoras putativas, pero no cura al ratón. Esto se combina con los inhibidores de señalización en estudios posteriores. Estos estudios requieren 8 ratones/xenoinjerto/tratamiento con 6 grupos de tratamiento + un control no tratado = 56 ratones por xenoinjerto, por ejemplo. Para cada inhibidor se puede seleccionar la dosis más pequeña que produce una disminución sustancial de células autorenovadoras (esto es, % CD44+/CD24- o MSFE).

15 Consideraciones estadísticas Para cada xenoinjerto en el estudio de quimioterapia, se pueden estudiar 8 ratones/fármaco/dosis y en realizaciones específicas esto proporciona al menos un 80% de potencia para detectar un efecto dosis-respuesta para cada fármaco y en cada línea de tejido de xenoinjerto. Esta estimación se basa en la revisión de los estudios iniciales, en los que el tratamiento dio como resultado un aumento de aproximadamente 1 desviación estándar (SD) en % CD44+/CD24- (log transformado) (aumento de 9 veces sin transformar). En una realización específica, la variabilidad dentro de una línea de xenoinjerto es menor que la variabilidad entre xenoinjertos de diferentes tumores, de manera que un cambio absoluto similar representa al menos 1.5 SD. En las realizaciones específicas, el grupo sin tratar no demuestra ningún cambio (esto es, % de CD44+/CD24- pre- y post-tratamiento son iguales), la dosis baja demuestra aproximadamente la mitad del cambio (0.75 SD) y la dosis alta demuestra el cambio completo (1.5 SD). En este escenario, el uso de un modelo mixto lineal con contrastes para probar la presencia de una tendencia lineal al nivel del 5% tiene un 80% de potencia. Los cambios en la eficiencia de formación de la mamósfera son igualmente detectables. Las curvas de crecimiento a corto plazo (por línea de tejido de fármaco y xenoinjerto) se comparan usando modelos mixtos con medidas repetidas.

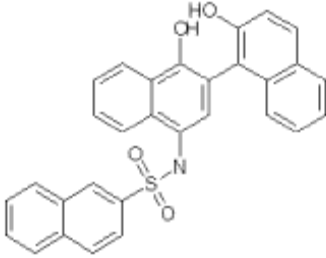
30 En un caso específico para los ensayos de tratamiento de MS, la MS residual después de Stat3 muestra una disminución significativa en el número de células iniciadoras de MS supervivientes después de volver a sembrar en placas. Los inhibidores más eficaces se ensayan entonces en xenoinjertos de cáncer humano. En ciertos aspectos, los inhibidores de Stat3 tienen poco efecto en el crecimiento del xenoinjerto del tumor de mama. Por el contrario, la quimioterapia sola puede causar una rápida regresión tumoral, pero los tumores eventualmente volverán a crecer. En ciertas realizaciones, la combinación de terapias provoca un encogimiento similar en comparación con la quimioterapia, pero los tumores no vuelven a crecer. La erradicación total de los tumores se confirma interrumpiendo la terapia para permitir que vuelvan a crecer si queda algún tumor, y la confirmación por evaluación patológica.

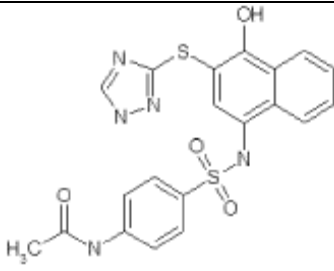
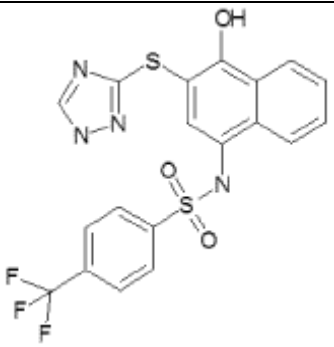
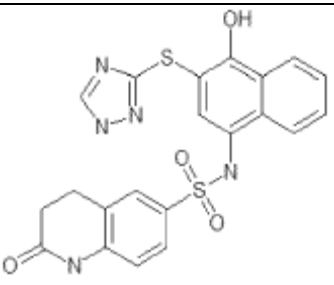
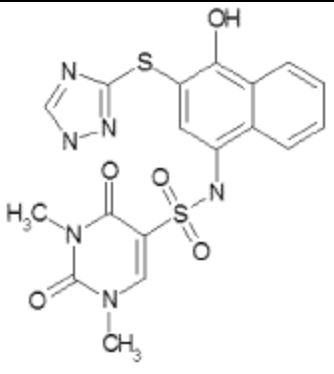
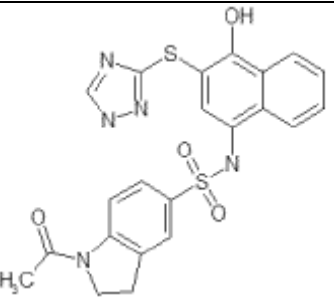
Ejemplo 17

Inhibidores de STAT 3 de ejemplo

Los inhibidores de Stat3 de ejemplo se proporcionan en la tabla 7 a continuación.

Tabla 7

F0808-0089 Com 188-70		C30H21NO4S	491.5702	7.729
-----------------------	-------------------------------------------------------------------------------------	------------	----------	-------

F5749-0155/Com 188-40		C20H17N5O4S2	455.5176	2.989
F5749-0192/Com 188-41		C19H13F3N4O3S2	466.4637	4.63276
F5749-0202/Com 188-42		C21H17N5O4S2	467.5287	2.894
F5749-0204/Com 188-43		C18H16N6O5S2	460.4934	0.807
F5749-0205/Com 188-44		C22H19N5O4S2	481.5558	3.129

Referencias

Las citas completas para las referencias citadas en este documento se proporcionan en la siguiente lista.

Publicaciones

- Akira, S., 2000. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 19:2607-2611.
- 5 Akira, S. 1997, IL-6-regulated transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 29:1401-1418.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3983-3988.
- Becker, S., Groner B, Muller CW (1998) Three-dimensional structure of the Stat3[beta] homodimer bound to DNA. *Nature* 394(6689): 145-151.
- 10 Bhasin, D., Cisek K, Pandharkar T, Regan N, Li C et al. (207) Design, synthesis, and studies of small molecule STAT3 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* In Press, Corrected Proof.
- Brinkley, BR, Beall PT, Wible LJ, Mace ML, Turner DS et al. (1980) Variations in Cell Form and Cytoskeleton in Human Breast Carcinoma Cells in Vitro. *Cancer Res* 40(9): 3118-3129.
- Bromberg, J., 2002. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 109:1139-1142.
- 15 Bromberg, J., and Darnell, J.E., Jr. 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19:2468-2473.
- Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Besser, D., Lathem, W.W., and Darnell, J.E., Jr. 1998. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* 18:2553-2558.
- 20 Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., and Darnell, J.E., Jr. 1999. Stat3 as an oncogene [published erratum appears in *Cell* 1999 Oct 15;99(2):239]. *Cell* 98:295-303.
- Cailleau R OM, Crueiger QVJ. (1978) Long term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 14: 911-915.
- Caldenhoven, E., van, D.T.B., Solari, R., Armstrong, J., Raaijmakers, J.A.M., Lammers, J.W.J., Koenderman, L., and de, G.R.P. 1996. STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *Journal of Biological Chemistry* 271:13221-13227.
- 25 Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., et al. 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10:105-115.
- 30 Chakraborty, A., Dyer KF, Cascio M, Mietzner TA, Tweardy DJ (1999) Identification of a Novel Stat3 Recruitment and Activation Motif Within the Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor. *Blood* 93(1): 15-24.
- Chakraborty, A., White, S.M., Schaefer, T.S., Ball, E.D., Dyer, K.F., and Tweardy, D.J. 1996. Granulocyte colonostimulating factor activation of Stat3 alpha and Stat3 beta in immature normal and leukemic human myeloid cells. *Blood* 88:2442-2449.
- 35 Chapman, R.S., Lourenco, P.C., Tonner, E., Flint, D.J., Selbert, S., Takeda, K., Akira, S., Clarke, A.R., and Watson, C.J. 1999. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev* 13:2604-2616.
- Chen, X., Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE et al. (1998) Crystal Structure of a Tyrosine Phosphorylated STAT-1 Dimer Bound to DNA. *Cell* 93(5): 827- 839.
- 40 Cohen, MS, Zhang C, Shokat KM, Taunton J (2005) Structural Bioinformatics-Based Design of Selective, Irreversible Kinase Inhibitors. *Science* 308(5726): 1318-1321.
- Coleman, DR, Ren Z, Mandal PK, Cameron AG, Dyer GA et al. (2005) Investigation of the Binding Determinants of Phosphopeptides Targeted to the Src Homology 2 Domain of the Signal Transducer and Activator of Transcription 3. Development of a High-Affinity Peptide Inhibitor. *J Med Chem* 48(21): 6661-6670.

- Costa-Pereira, A.P., Tininini, S., Strobl, B., Alonzi, T., Schlaak, J.F., Is'harc, H., Gesualdo, I., Newman, S.J., Kerr, I.M., and Poli, V. 2002. Mutational switch of an IL-6 response to an interferon-gamma-like response. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8043-8047.
- 5 Daling, J.R., and Malone, K.E. 2003. Incidence of invasive breast cancer by hormone receptor status from 1992 to 1998. *J Clin Oncol* 21:28-34.
- Darnell JE (2005), Validating Stat3 in cancer therapy. *Nat Med* 11(6): 595-596.
- Dave, B., and Chang, J. 2009. Treatment resistance in stem cells and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14:79-82.
- 10 Diaz, N., Minton, S., Cox, C., Bowman, T., Gritsko, T., Garcia, R., Eweis, I., Wloch, M., Livingston, S., Seijo, E., et al. 2006. Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clin Cancer Res* 12:20-28.
- Dong, S., Chen S-J, Tweardy DJ (2003) Cross-talk between Retinoic Acid and Stat3 Signaling Pathways in Acute Promyelocytic Leukemia. *Leuk Lymphoma* 44: 2023-2029.
- 15 Dong, S., Cheng, Z., and Tweardy, D.J. 2003. Cross-talk between retinoic acid and Stat3 signaling pathways in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia and Lymphoma* In press.
- Dunn, GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3(11): 991-998.
- Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C., and Levy, D.E. 1996. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84:443-450.
- 20 Eckert, H., Bajorath J (2007) Molecular similarity analysis in virtual screening: foundations, limitations and novel approaches. *Drug discovery today* 12(5-6): 225-233.
- Epling-Burnette, P.K., Liu, J.H., Catlett-Falcone, R., Turkson, J., Oshiro, M., Kothapalli, R., Li, Y., Wang, J.M., Yang-Yen, H.F., Karras, J., et al. 2001. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest* 107:351-362.
- 25 Fiala, S., 1968. The cancer cell as a stem cell unable to differentiate. A theory of carcinogenesis. *Neoplasma* 15:607-622.
- Fu, X.-Y., Schindler, C, Improta, T., Aebersold, R., and Darnell, J.E., Jr. 1992. The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:7840-7843.
- 30 Garcia R, Yu CL, Hudnall A, Catlett R, Nelson KL et al. (1997) Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 8(12): 1267-1276.
- Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S et al. (2001) Constitutive activation of Stat3 by the Src and Jak tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 20: 2499-2513.
- 35 Garcia, R., and Jove, R. 1998. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *Journal of Biomedical Science* In press.
- Grandis, J.R., Drenning, S.D., Zeng, Q., Watkins, S.C., Melhem, M.F., Endo, S., Johnson, D.E., Huang, L., He, Y., and Kim, J.D. 2000. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4227-4232.
- 40 Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Nam, S., Eweis, I., Diaz, N., Sullivan, D., et al. 2006. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 12:11-19.
- Haan, S., Hemmann, U., Hassiepen, U., Schaper, F., Schneider-Mergener, J., Wollmer, A., Heinrich, P.C., and Grotzinger, J. 1999. Characterization and binding specificity of the monomeric STAT3-SH2 domain. *J Biol Chem* 274:1342-1348.

- Huang, Y., Qiu J, Dong S, Redell MS, Poli V et al. (2007) Stat3 Isoforms, α and β , Demonstrate Distinct Intracellular Dynamics with Prolonged Nuclear Retention of Stat3 Mapping to Its Unique C-terminal End. *J Biol Chem* 282(48): 34958-34967.
- 5 Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., and Thun, M.J. 2006. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 56:106-130.
- Jing, N., Tweardy DJ (2005) Targeting Stat3 in cancer therapy. *anticancer Drugs* 16(6): 601-607.
- Jing, N., Zhu Q, Yuan P, Li Y, Mao L et al. (2006) Targeting signal transducer and activator of transcription 3 with G-quartet oligonucleotides: a potential novel therapy for head and neck cancer. *Mol Cancer Ther* 5(2): 279-286.
- 10 Jing, N., Li Y, Xu X, Sha W, Li P et al. (2003) Targeting Stat3 with G-quartet oligodeoxynucleotides in human cancer cells. *DNA Cell Biol* 22(11): 685-696.
- Jing, N., Li, Y., Xiong, W., Sha, W., Jing, L., and Tweardy, D.J. 2004. G-quartet oligonucleotides: a new class of signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors that suppresses growth of prostate and breast tumors through induction of apoptosis. *Cancer Res* 64:6603-6609.
- 15 Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7556-7561.
- Kato, T., Sakamoto E, Kutsuna H, Kimura-Eto A, Hato F et al. (2004) Proteolytic Conversion of STAT3 α to STAT3 γ in Human Neutrophils: ROLE OF GRANULE-DERIVED SERINE PROTEASES. *J Biol Chem* 279(30): 31076-31080.
- 20 Kim, J.K., Xu Y, Xu X, Keene DR, Gurusiddappa S et al. (2005) A Novel Binding Site in Collagen Type III for Integrins $\alpha 1 \beta 1$ and $\alpha 2 \beta 1$. *J Biol Chem* 280(37): 32512-32520.
- Kortylewski, M., Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S et al. (2005) Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* 11(12): 1314-1321.
- 25 Leong, P.L., Andrews, G.A., Johnson, D.E., Dyer, K.F., Xi, S., Mai, J.C., Robbins, P.D., Gadiparthi, S., Burke, N.A., Watkins, S.F., et al. 2003. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4138-4143.
- Li, C.I., Daling, J.R., and Malone, K.E. 2003. Incidence of invasive breast cancer by hormone receptor status from 1992 to 1998. *J Clin Oncol* 21:28-34.
- 30 Li, L., and Shaw, P.E. 2002. Autocrine-mediated activation of STAT3 correlates with cell proliferation in breast carcinoma lines. *J Biol Chem* 277:17397-17405.
- Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., et al. 2008. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 100:672-679.
- 35 Lin, Q., Lai R, Chirieac LR, Li C, Thomazy VA et al. (2005) Constitutive Activation of JAK3/STAT3 in Colon Carcinoma Tumors and Cell Lines: Inhibition of JAK3/STAT3 Signaling Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Colon Carcinoma Cells. *Am J Pathol* 167(4): 969-980.
- Maritano, D., Sugrue, M.L., Tininini, S., Dewilde, S., Strobl, B., Fu, X., Murray-Tait, V., Chiarle, R., and Poli, V. 2004. The STAT3 isoforms α and β have unique and specific functions. *Nat Immunol* 5:401-409.
- McMurray JS (2006), A New Small-Molecule Stat3 Inhibitor. *Chemistry & Biology* 13(11): 1123-1124.
- 40 Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D., et al. 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84:431-442.
- Minino, A.M., Heron, M.P., Murphy, S.L., and Kochanek, K.D. 2007. Deaths: final data for 2004. *Natl Vital Stat Rep* 55:1-119.

- Mora, L.B., Buettner, R., Seigne, J., Diaz, J., Ahmad, N., Garcia, R., Bowman, T., Falcone, R., Fairclough, R., Cantor, A., et al. 2002. Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* 62:6659-6666.
- 5 Neculai, D., Neculai AM, Verrier S, Straub K, Klumpp K et al. (2005) Structure of the Unphosphorylated STAT5a Dimer. *J Biol Chem* 280(49): 40782-40787.
- Nemethy, G., Gibson KD, Palmer KA, Yoon CN, Paterlini G et al. (1992) Energy Parameters in Polypeptides. 10. Improved Geometrical Parameters and Nonbonded Interactions for Use in the ECEPP/3 Algorithm, with Application to Proline-Containing Peptides. *JPhys Chem* 96: 6472-6484.
- 10 Park, O.K., Schaefer, T.S., and Nathans, D. 1996. In vitro activation of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:13704-13708.
- Park, O.K., Schaefer, L.K., Wang, W., and Schaefer, T.S. 2000. Dimer stability as a determinant of differential DNA binding activity of Stat3 isoforms. *J Biol Chem* 275:32244-32249.
- Qing, Y., and Stark, G.R. 2004. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *J Biol Chem* 279:41679-41685.
- 15 Ramana, C., Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark G (2000) Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene* 19(21): 2619-2627.
- Real, P.J., Sierra, A., De Juan, A., Segovia, J.C., Lopez-Vega, J.M., and Fernandez-Luna, J.L. 2002. Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene* 21:7611-7618.
- 20 Redell, MS, Tweardy DJ (2006) Targeting transcription factors in cancer: Challenges and evolving strategies. *Drug Discovery Today: Technologies* 3(3): 261-267.
- Redell, M.S., and Tweardy, D.J. 2005. Targeting transcription factors for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 11:2873-2887.
- Ren, Z., Cabell, L.A., Schaefer, T.S., and McMurray, J.S. 2003. Identification of a high-affinity phosphopeptide inhibitor of stat3. *Bioorg Med Chem Lett* 13:633-636.
- 25 Ryan, J.J., McReynolds, L.J., Huang, H., Nelms, K., and Paul, W.E. 1998. Characterization of a mobile Stat6 activation motif in the human IL-4 receptor. *J Immunol* 161:1811-1821.
- Satya-Prakash KL PS, Hsu TC, Olive M, Cailleau R (1981) Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: high frequencies of 1q, 11q, and HeLa-like marker chromosomes. *Cancer GenetCytogenet* 3: 61-73.
- Schaefer, T.S., Sanders, L.K., and Nathans, D. 1995. Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:9097-9101.
- 30 Schindler, C., and Darnell, J.E., Jr. 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. [Review]. *Annual Review of Biochemistry* 64:621-651.
- Schindler, C., Fu, X.Y., Improt, T., Aebersold, R., and Darnell, J.E., Jr. 1992. Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:7836-7839.
- 35 Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T.U., and Berg, T. 2006. Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem Biol* 13:1235-1242.
- Shao, H., Cheng HY, Cook RG, Tweardy DJ (2003) Identification and Characterization of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Recruitment Sites within the Epidermal Growth Factor Receptor. *Cancer Res* 63(14): 3923-3930.
- 40 Shao, H., Xu X, Jing N, Tweardy DJ (2006) Unique Structural Determinants for Stat3 Recruitment and Activation by the Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor at Phosphotyrosine Ligands 704 and 744. *J Immunol* 176(5):2933-2941.
- 45 Shao, H., Xu X, Mastrangelo M-AA, Jing N, Cook RG et al. (2004) Structural Requirements for Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Binding to Phosphotyrosine Ligands Containing the YXXQ Motif. *J Biol Chem* 279(18): 18967-18973.

- Sharp, Z.D., Mancini MG, Hinojos CA, Dai F, Berno V et al. (2006) Estrogen-receptor- {alpha} exchange and chromatin dynamics are ligand- and domain-dependent. *J Cell Sci* 119(19): 4101-4116.
- 5 Siddiquee, K., Zhang S, Guida WC, Blaskovich MA, Greedy B et al. (2007) Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(18): 7391-7396.
- Song, H., Wang R, Wang S, Lin J (2005) A low-molecular-weight compound discovered through virtual database screening inhibits Stat3 function in breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(13):4700-4705.
- 10 Strecker, T.E., Shen, Q., Zhang, Y., Hill, J.L., Li, Y., Wang, C., Kim, H.T., Gilmer, T.M., Sexton, K.R., Hilsenbeck, S.G., et al. 2009. Effect of lapatinib on the development of estrogen receptor-negative mammary tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 101:107-113.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3801-3804.
- Totrov, M., Abagyan R (1997) *Proteins* 1: 215-220.
- 15 Turkson, J., 2004. STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery. *Expert Opin Ther Targets* 8:409-422.
- Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R.P., and Jove, R. 1998. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol* 18:2545-2552.
- Turkson, J., Jove R (2000) STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 19:6613-6626.
- 20 Turkson, J., Ryan, D., Kim, J.S., Zhang, Y., Chen, Z., Haura, E., Laudano, A., Sebt, S., Hamilton, A.D., and Jove, R. 2001. Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem* 276:45443-45455.
- Turkson, J., Zhang, S., Palmer, J., Kay, H., Stanko, J., Mora, L.B., Sebt, S., Yu, H., and Jove, R. 2004. Inhibition of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 activation by novel platinum complexes with potent antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 3:1533-1542.
- 25 Tweardy, DJ, Redell MS (2005) Targeting Transcription Factors for Cancer Therapy. *Curr Pharm Des* 11: 2873-2887.
- Tweardy, DJ, Wright TM, Ziegler SF, Baumann H, Chakraborty A et al. (1995) Granulocyte colony-stimulating factor rapidly activates a distinct STAT- like protein in normal myeloid cells. *Blood* 86(12): 4409-4416.
- Uddin, S., Hussain, A.R., Manogaran, P.S., Al-Hussein, K., Plataniias, L.C., Gutierrez, M.I., and Bhatia, K.G. 2005. Curcumin suppresses growth and induces apoptosis in primary effusion lymphoma. *Oncogene* 24:7022-7030.
- 30 Wiederkehr-Adam, M., Ernst, P., Muller, K., Bieck, E., Gombert, F.O., Ottl, J., Graff, P., Grossmuller, F., and Heim, M.H. 2003. Characterization of phosphopeptide motifs specific for the Src homology 2 domains of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT3. *J Biol Chem* 278:16117-16128.
- Xu, X., Kasembeli, M.M., Jiang, X., Tweardy, B.J., and Tweardy, D.J. 2009. Chemical probes that competitively and selectively inhibit Stat3 activation. *PLoS ONE* 4:e4783.
- 35 Yoo, J.Y., Huso, D.L., Nathans, D., and Desiderio, S. 2002. Specific ablation of Stat3beta distorts the pattern of Stat3-responsive gene expression and impairs recovery from endotoxic shock. *Cell* 108:331-344.
- Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G.S., Jackson, P., Groopman, J.D., Manning, J.E., Harris, C.C., and Herman, J.G. 2001. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 28:29-35.
- 40 Yu, C.L., Meyer, D.J., Campbell, G.S., Larner, A.C., Carter-Su, C., Schwartz, J., and Jove, R. 1995. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 269:81-83.
- Yu, H., Jove R (2004) The STATs of cancer- new molecular targets come of age. *Nature Reviews Cancer* 4(2): 97-105.
- Zhang RD FI, Price JE (1991) Relative malignant potential of human breast carcinoma cell lines established from pleural effusions and brain metastasis. *Invasion Metastasis* 11: 204-215.

Zhu, Q., Jing N (2007) Computational study on mechanism of G-quartet oligonucleotide T40214 selectively targeting Stat3. Journal of Computer-Aided Molecular Design 21(10): 641-648.

Lista de secuencias

<110> BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE

5 Tweardy, David J.

Xu, Xuejun

kasembeli, Moses M.

<120> INHIBIDORES STAT3

<130> HO-P03570W00

10 <140> TBA

<141> 2009-06-03

<150> 61/058,742

<151> 2008-06-04

<160> 1

15 <170> PatenIn version 3.5

<210> 1

<211> 68

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Todo; dominio SH2

<400> 1

Met Val Asn Arg Glu Val Leu Asp Gln Val Glu Arg Gly Tyr Arg Met
1 5 10 15

Pro Cys Pro Pro Glu Cys Pro Glu Ser Leu His Asp Leu Met Cys Gln
20 25 30

Cys Trp Arg Lys Glu Pro Glu Glu Arg Pro Thr Phe Glu Tyr Leu Gln
35 40 45

Ala Phe Leu Glu Asp Tyr Phe Thr Ser Thr Glu Pro Gln Tyr Gln Pro
50 55 60

Gly Glu Asn Leu
65

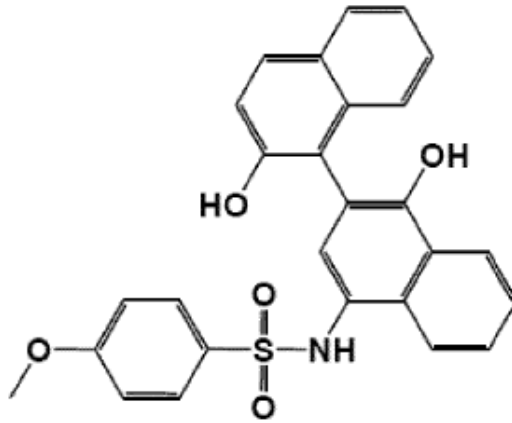
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para su uso como medicamento mediante la inhibición de Stat3 en una célula, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

Ácido 4-[(3-[(carboximetil)tio]-4-hidroxi-1-naftil)amino]sulfonil] benzoico (Com 188)

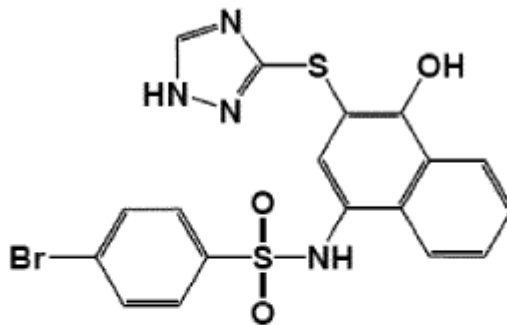
5 Ácido 4{5-[(3-etil-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil]-2-furil}benzoico (Com 30)

Ácido 4-cloro-3-{5-[(1,3-dietil-4,6-dioxo-2-tioxotetrahidro-5(2H)-pirimidinilideno)metil]-2-furil}benzoico (Com 30-12)



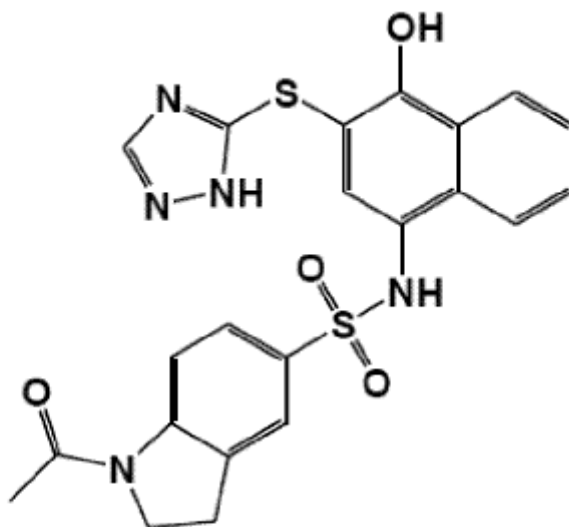
N-(2,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-
4-metoxi-bencenosulfonamida

(Comp. 188-9)



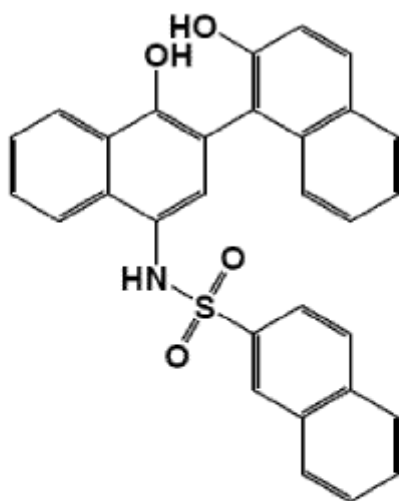
4-Bromo-N-[4-hidroxi-3-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-il]-bencenosulfonamida

(Comp. 188-15)



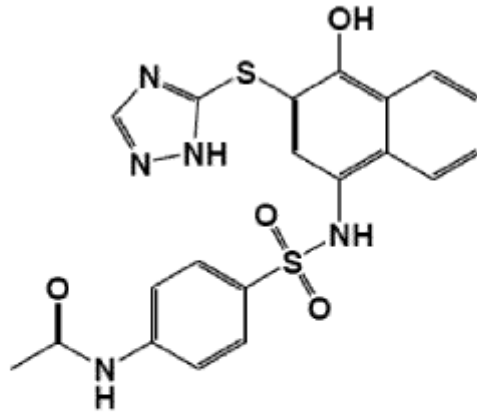
Ácido 1-acetil-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfónico
[4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-
naftalen-1-il]-amida

(Comp. 188-44)



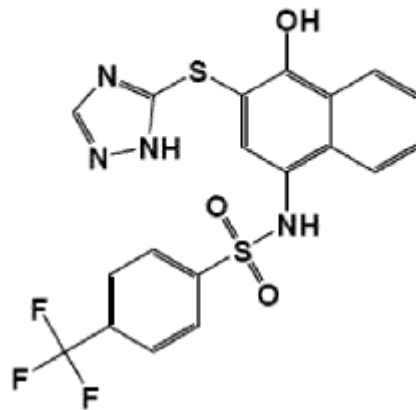
Ácido naftaleno-2-sulfónico (2,1'-dihidroxi-
[1,2']binaftalenil-4'-il)-amida

(Comp. 188-70)



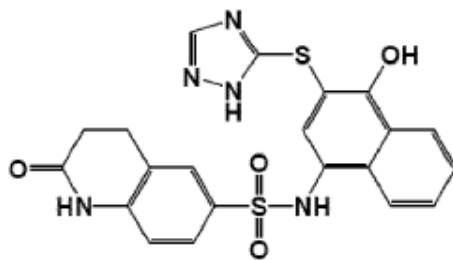
N-{4-[4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-ilsulfamoil]-fenil}-acetamida

(Comp. 188-40)



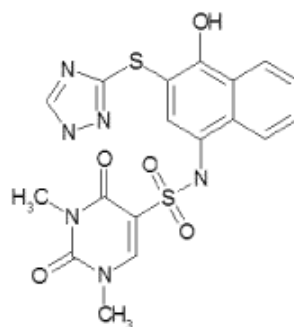
N-[4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-il]-4-trifluorometil-bencenosulfonamida

(Comp. 188-41)

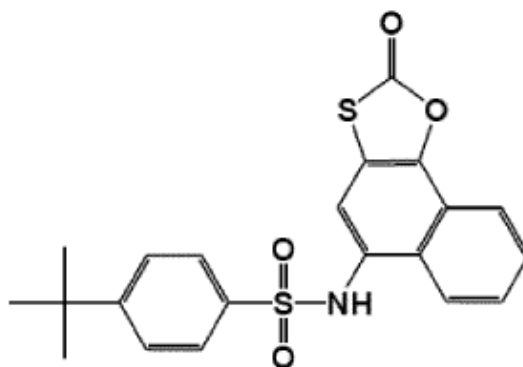


Ácido 2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-quinolina-6-sulfónico [4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-il]-amida

(Comp. 188-42)



(Comp 188-43)



4-tert-Butil-N-(2-oxo-nafto [2,1-d][1,3]oxatol-5-il)-bencenosulfonamida

(Comp. 188-33)

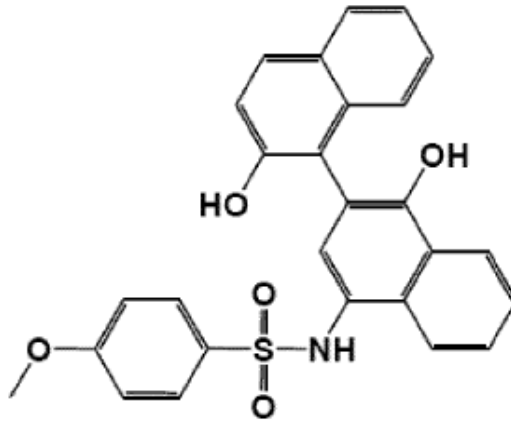
y una mezcla de los mismos, en la que la célula está in vivo en un ser humano y en la que el ser humano se sabe, sospecha o en riesgo de desarrollar cáncer, una enfermedad hiperproliferativa, fibrosis pulmonar, asma o enfermedad inflamatoria intestinal.

5 2. Un método in vitro de inhibición de Stat3 en una célula, en el que el método no es un método terapéutico y comprende entregar a la célula una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

Ácido 4-[(3-[(carboximetil) tio]-4-hidroxi-1-naftil)amino]sulfonil benzoico (Com 188)

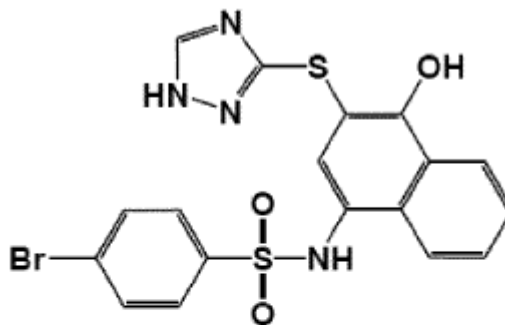
Ácido 4{5-[(3-etil-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil]-2-furil}benzoico (Com 30)

Ácido 4-cloro-3-{5-[(1,3-dietil-4,6-dioxo-2-tioxotetrahidro-5(2H)-pirimidinilideno)metil]-2-furil}benzoico (Com 30-12)



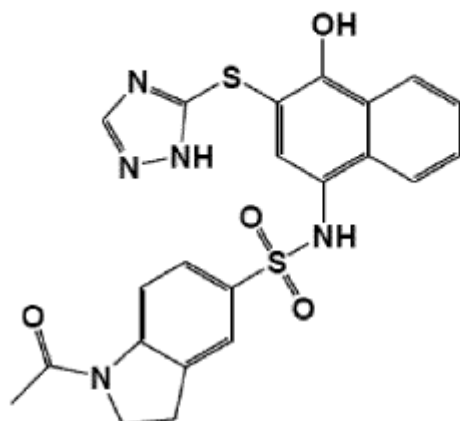
N-(2,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-
4-metoxi-bencenosulfonamida

(Comp. 188-9)



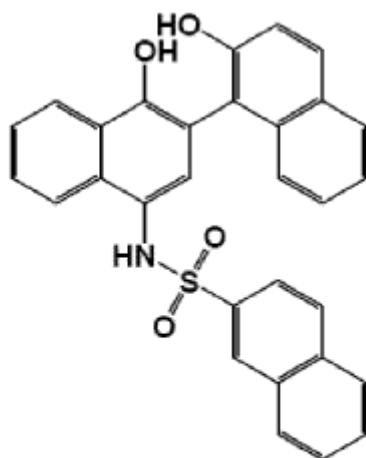
4-Bromo-N-[4-hidroxi-3-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-il]-bencenosulfonamida

(Comp. 188-15)



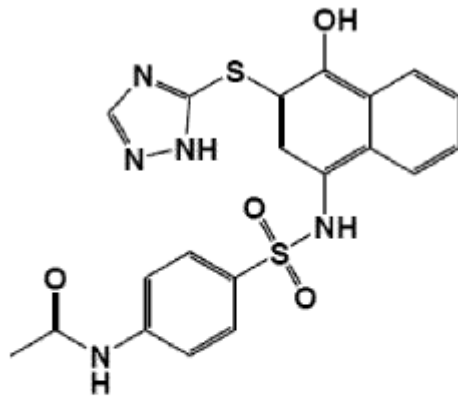
Ácido 1-acetil-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfónico
[4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-il-sulfani)-
naftalen-1-il]-amida

(Comp. 188-44)



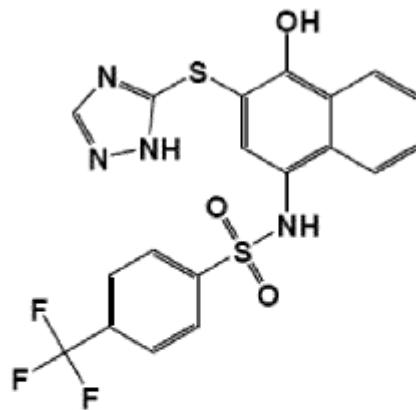
Ácido naftaleno-2-sulfónico (2,1'-dihidroxi-
[1,2']binaftalenil-4'-il)-amida

(Comp. 188-70)



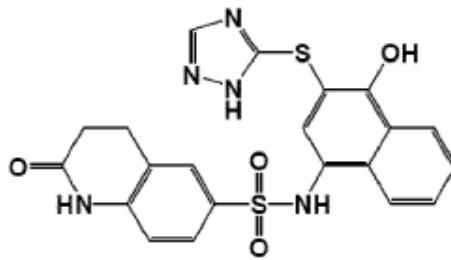
N-{4-[4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-ilsulfamoil]-fenil}-acetamida

(Comp. 188-40)



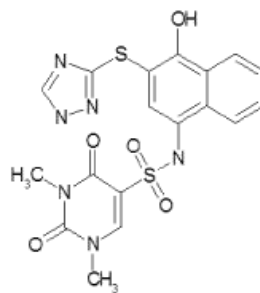
N-[4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-il]-4-trifluorometil-bencenosulfonamida

(Comp. 188-41)

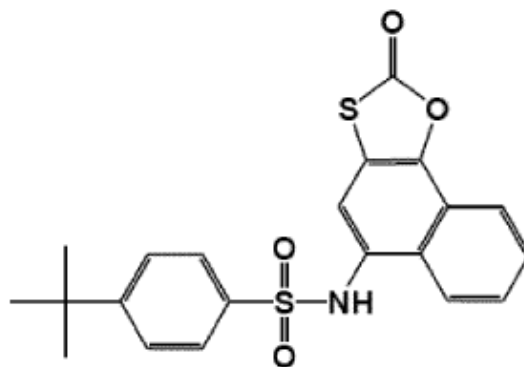


Ácido 2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-quinolina-6-sulfónico [4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-il]-amida

(Comp. 188-42)



(Comp 188-43)



4-tert-Butil-N-(2-oxo-nafto [2,1-d][1,3]oxatol-5-il)-bencenosulfonamida

(Comp. 188-33)

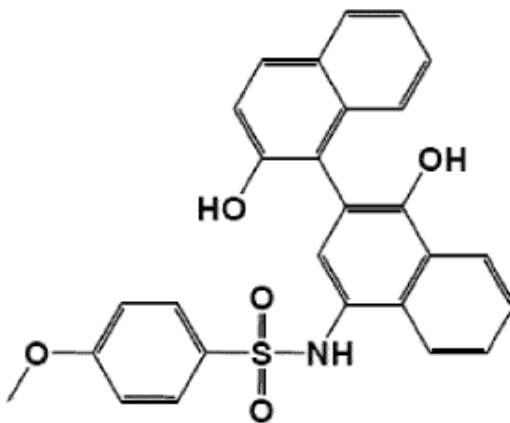
y una mezcla de los mismos.

3. El compuesto para uso según la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que Stat1 no está inhibido por el compuesto.
4. El compuesto para uso según la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que la célula es una célula madre cancerosa.
5. El compuesto para uso según la reivindicación 4 o el método de la reivindicación 4, en el que la célula madre cancerosa es una célula madre leucémica.
6. El compuesto para uso según la reivindicación 4 o el método de la reivindicación 4, en el que la célula madre cancerosa es una célula madre cancerosa de mama.
- 10 7. Un compuesto para uso en el tratamiento o prevención del cáncer en un individuo, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en

Ácido 4-[(3-[(carboximetil)tio]-4-hidroxi-1-naftil)amino]sulfonil] benzoico (Com 188)

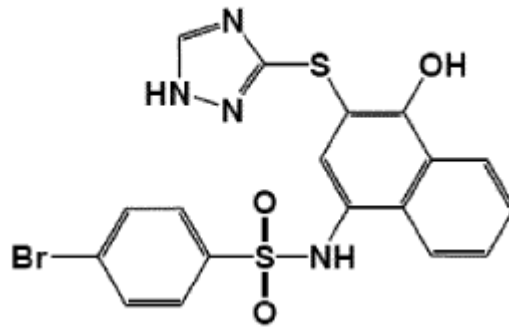
Ácido 4{5-[(3-etil-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil]-2-furil}benzoico (Com 30)

Ácido 4-cloro-3-{5-[(1,3-dietil-4,6-dioxo-2-tioxotetrahidro-5(2H)-pirimidinilideno)metil]-2-furil}benzoico (Com 30-12)



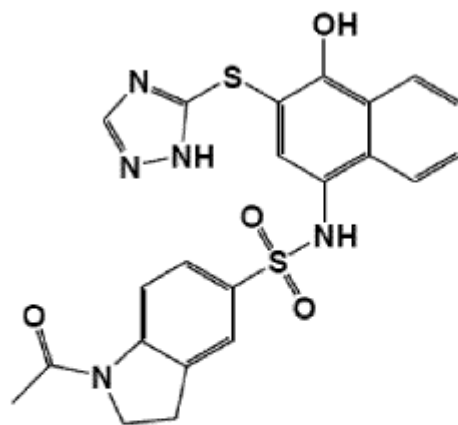
N-(2,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-
4-metoxi-bencenosulfonamida

(Comp. 188-9)



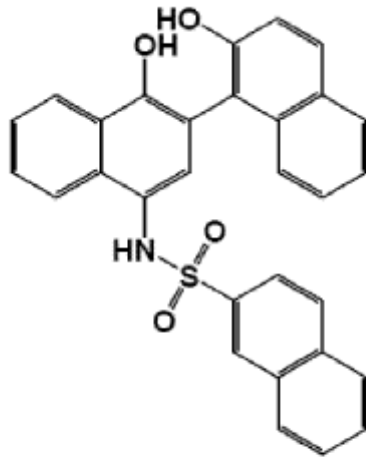
4-Bromo-N-[4-hidroxi-3-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-il]-bencenosulfonamida

(Comp. 188-15)



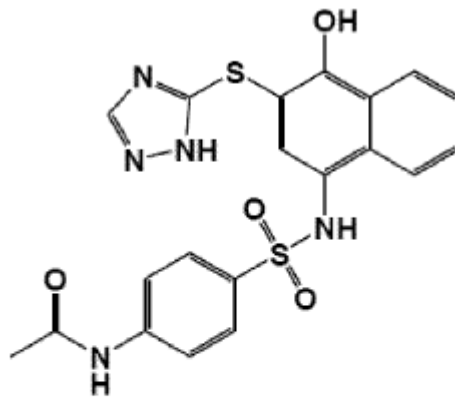
Ácido 1-acetil-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfónico
[4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-
naftalen-1-il]-amida

(Comp. 188-44)



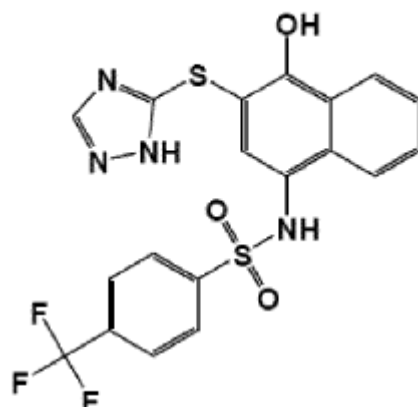
Ácido naftaleno-2-sulfónico (2,1'-dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-amida

(Comp. 188-70)



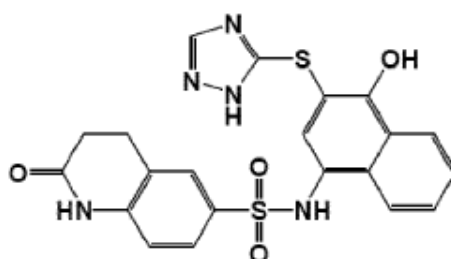
N-{4-[4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-ilsulfamoil]-fenil}-acetamida

(Comp. 188-40)



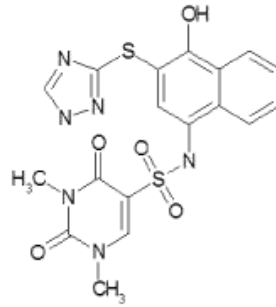
N-[4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-il]-4-trifluorometil-bencenosulfonamida

(Comp. 188-41)

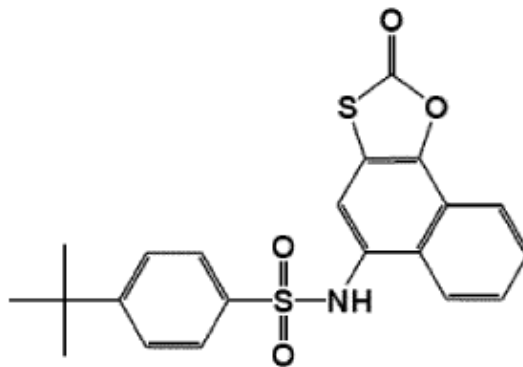


Ácido 2-oxo-1,2,3,4-tetrahidro-quinolina-6-sulfónico [4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-il]-amida

(Comp. 188-42)



(Comp 188-43)



4-tert-Butil-N-(2-oxo-nafto [2,1-d][1,3]oxatol-5-il)-bencenosulfonamida

(Comp. 188-33)

y una mezcla de los mismos.

8. El compuesto para uso según la reivindicación 7, en el que el individuo es un ser humano.

5 9. El compuesto para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 8, en el que se sabe que el ser humano tiene cáncer y está recibiendo una terapia adicional.

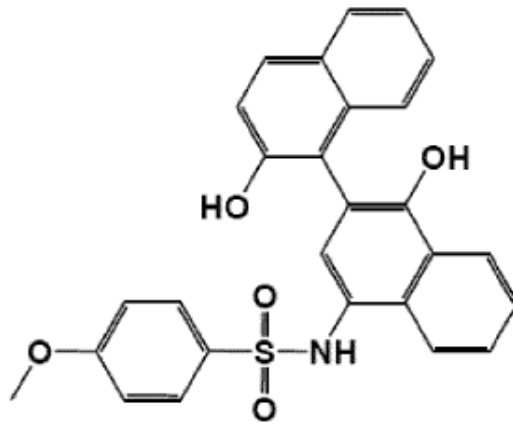
10. El compuesto para uso según la reivindicación 9, en el que la terapia adicional es quimioterapia, cirugía, radiación o una combinación de los mismos.

11. Un kit para uso en el tratamiento de cáncer, que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

10 Ácido 4-[(3-[(carboximetil)tio]-4-hidroxi-1-naftil)amino]sulfonil] benzoico (Com 188)

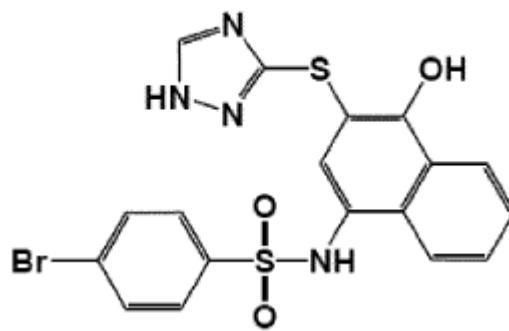
Ácido 4{5-[(3-etil-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil]-2-furil}benzoico (Com 30)

Ácido 4-cloro-3-{5-[(1,3-dietil-4,6-dioxo-2-tioxotetrahydro-5(2H)-pirimidinilideno)metil]-2-furil}benzoico (Com 30-12)



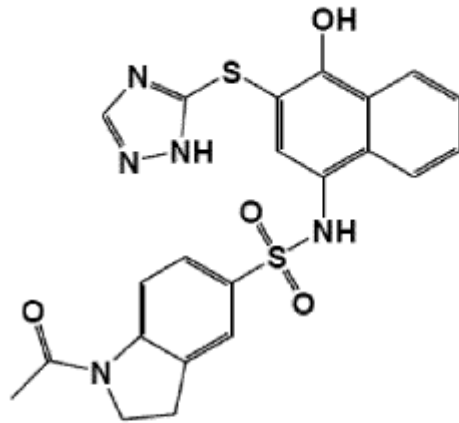
N-(2,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-
4-metoksi-bencenosulfonamida

(Comp. 188-9)



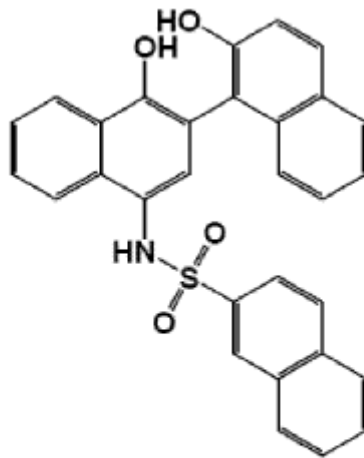
4-Bromo-N-[4-hidroxi-3-(1H-[1,2,4]triazol-3-
ilsulfanil)-naftalen-1-il]-bencenosulfonamida

(Comp. 188-15)



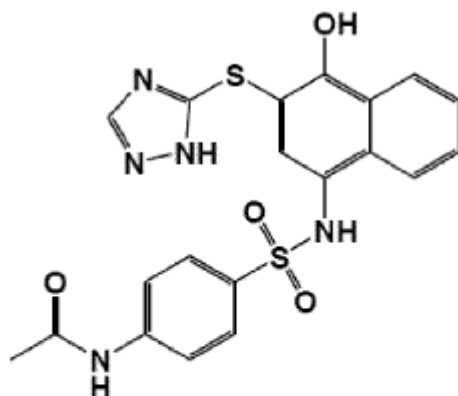
Ácido 1-acetil-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfónico
[4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-il-sulfani)-
naftalen-1-il]-amida

(Comp. 188-44)



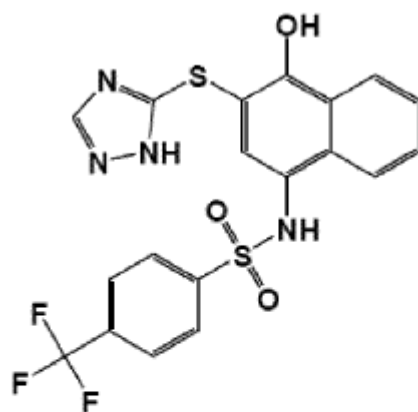
Ácido naftaleno-2-sulfónico (2,1'-dihidroxi-
[1,2']binaftalenil-4'-il)-amida

(Comp. 188-70)



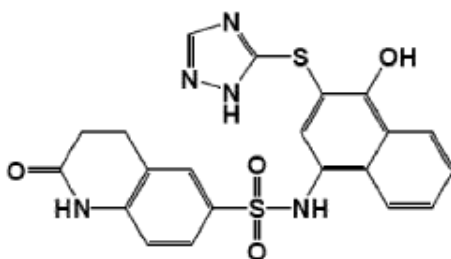
N-{4-[4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-ilsulfamoil]-fenil}-acetamida

(Comp. 188-40)



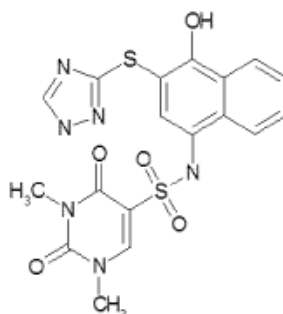
N-[4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-il]-4-trifluorometil-bencenosulfonamida

(Comp. 188-41)

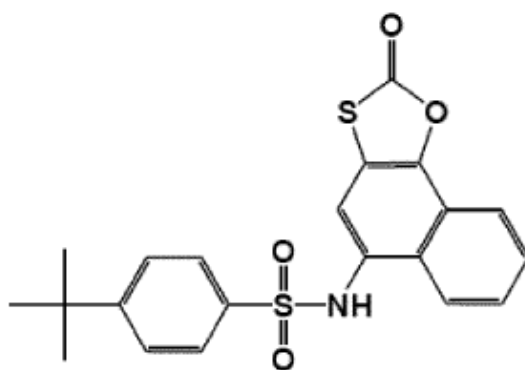


Ácido 2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-quinolina-6-sulfónico [4-hidroxi-3-(2H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-naftalen-1-il]-amida

(Comp. 188-42)



(Comp 188-43)



4-tert-Butil-N-(2-oxo-nafto [2,1-d][1,3]oxatol-5-il)-bencenosulfonamida

(Comp. 188-33)

y una mezcla de los mismos almacenada en un recipiente apropiado.

12. El kit para su uso según la reivindicación 11, que comprende además un tratamiento adicional contra el cáncer.

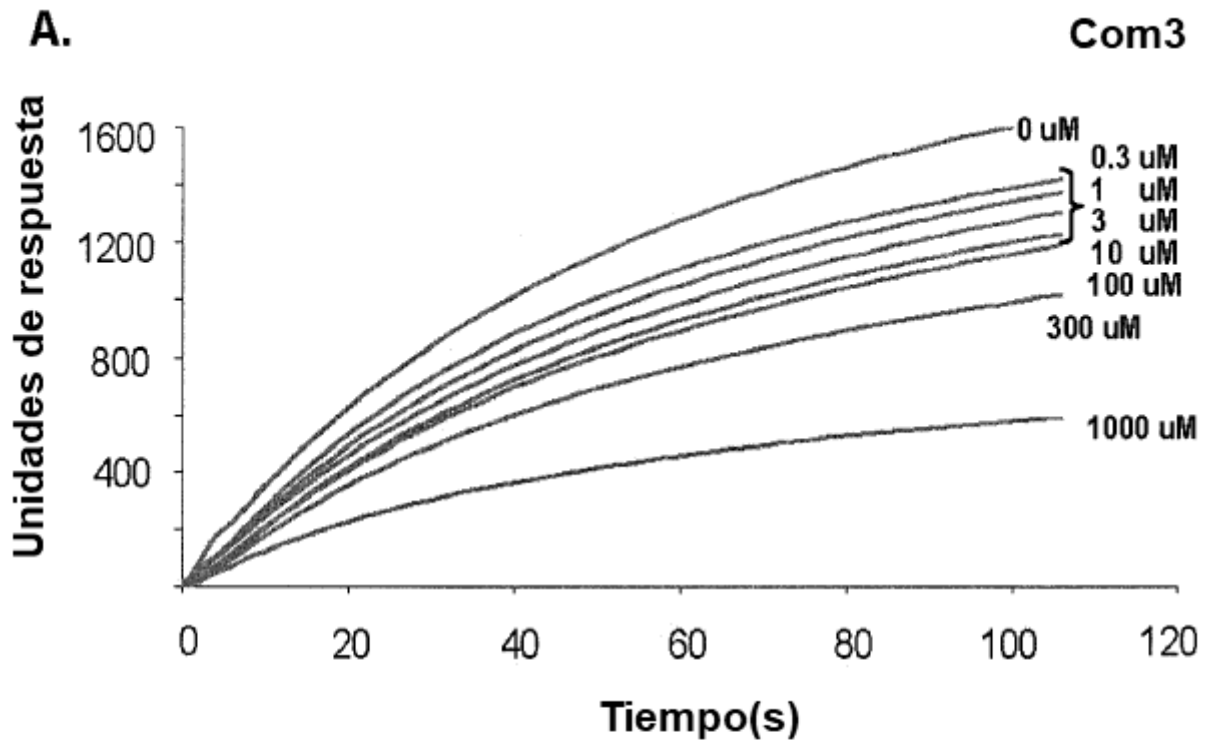


FIG. 1

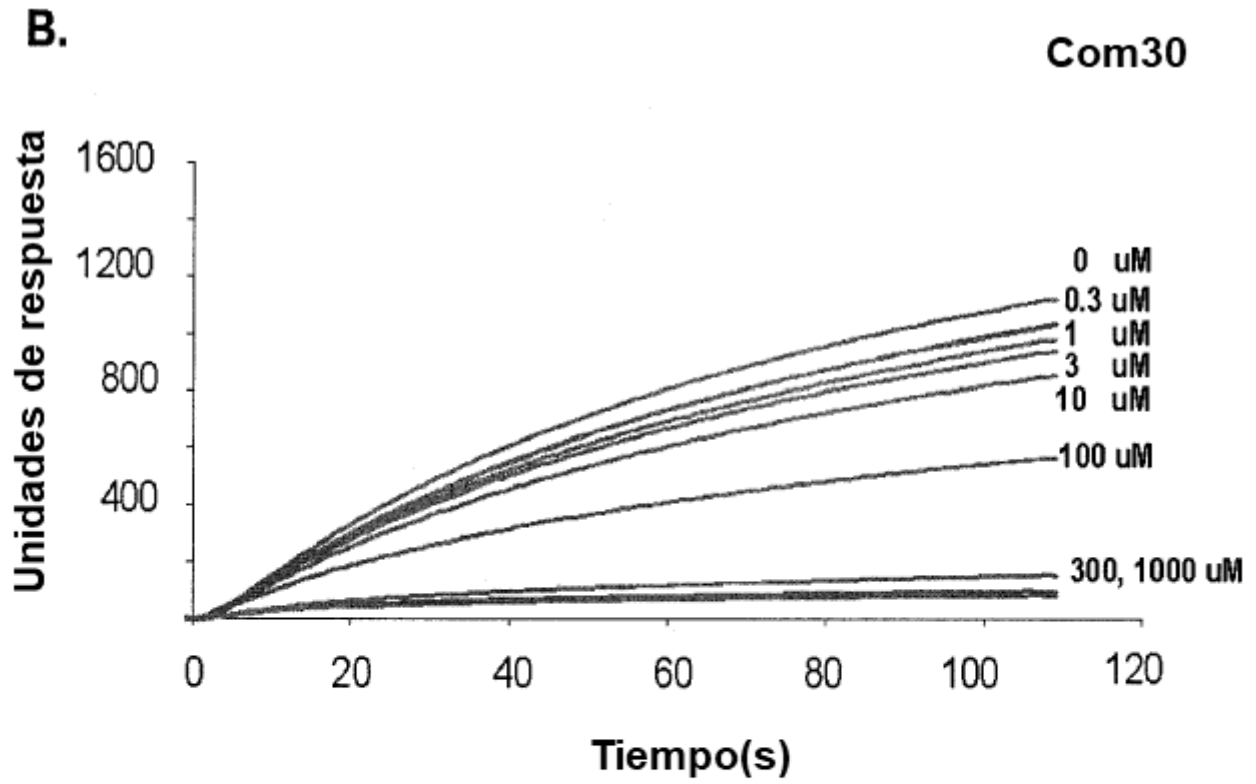


FIG. 1

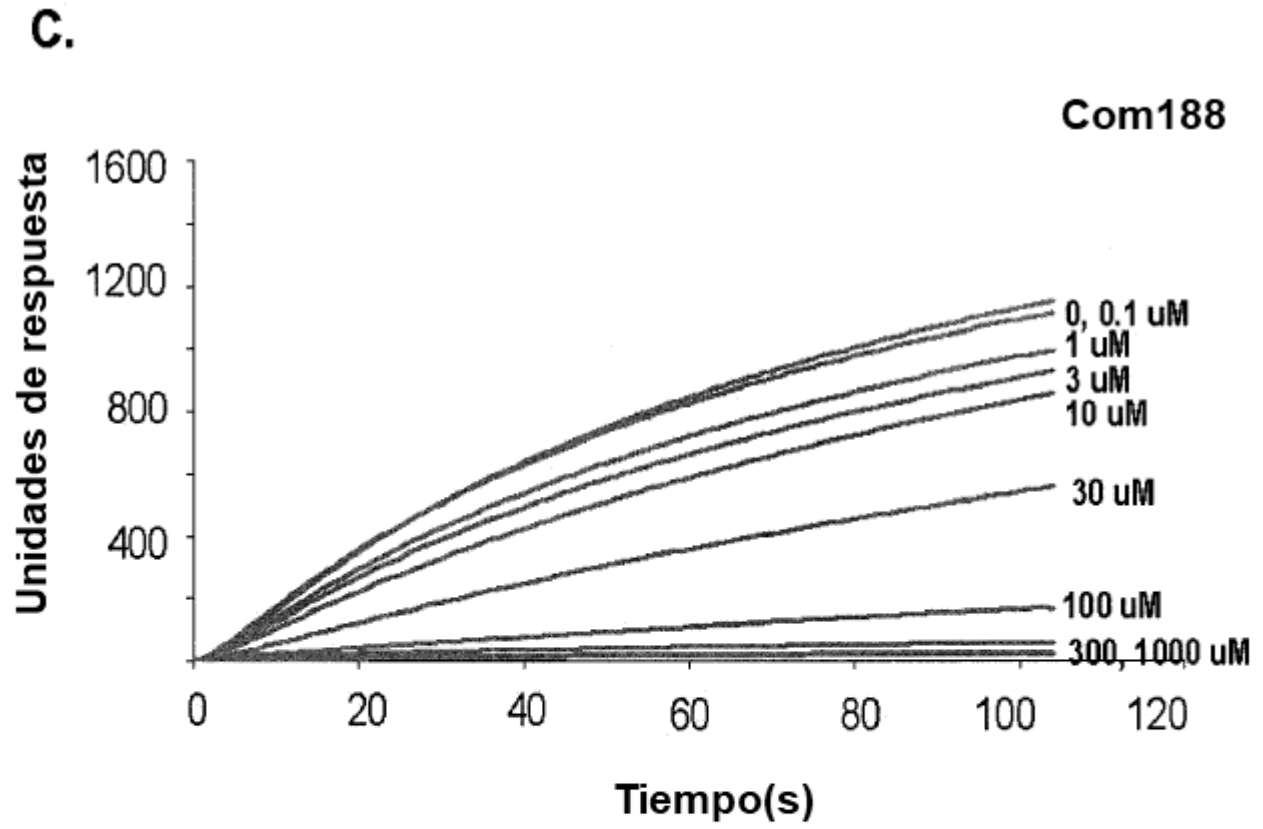


FIG. 1

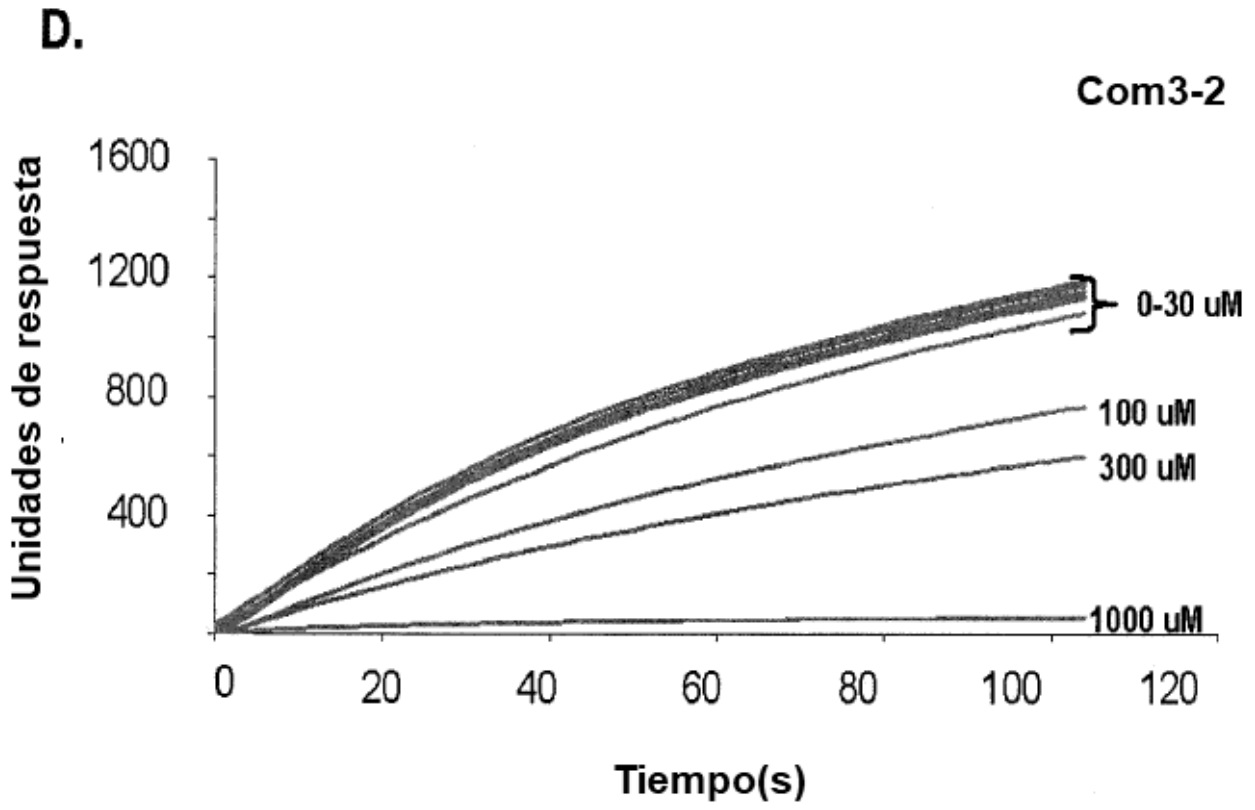


FIG. 1

F.

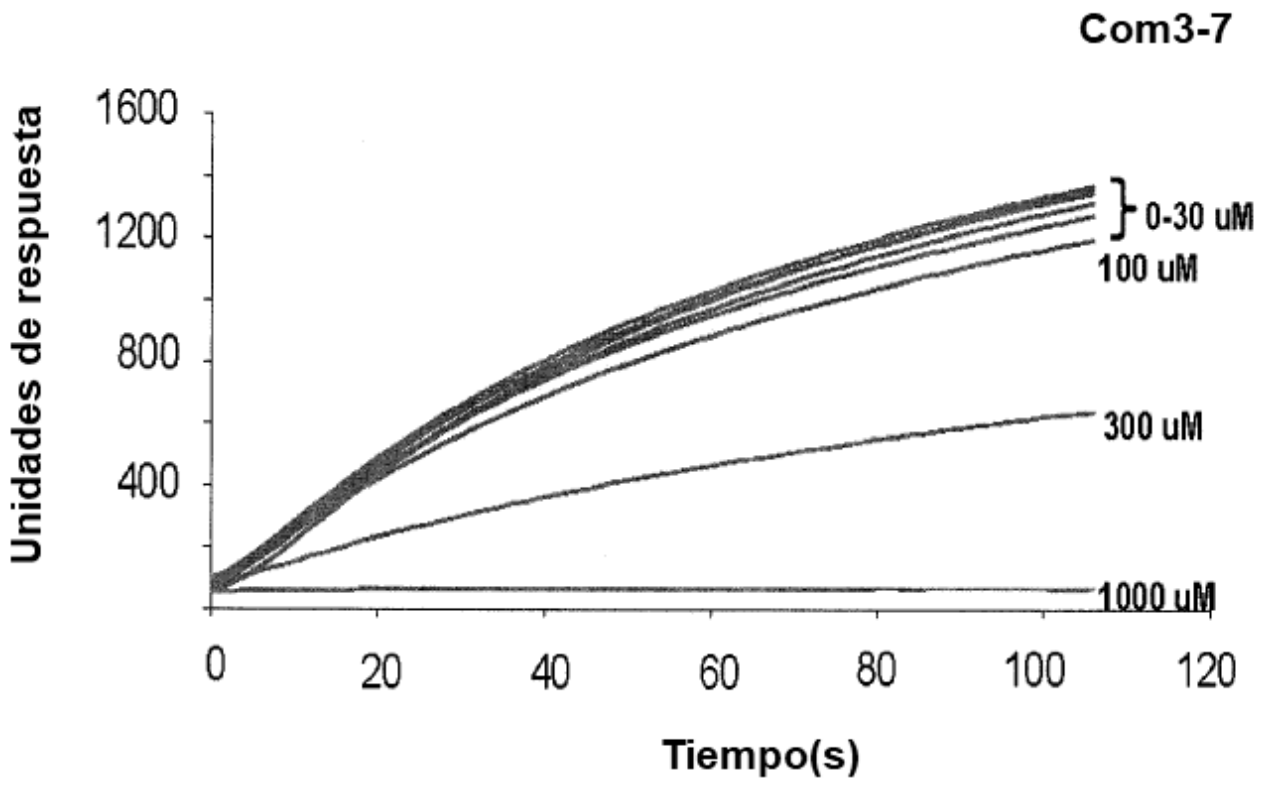


FIG. 1

F.

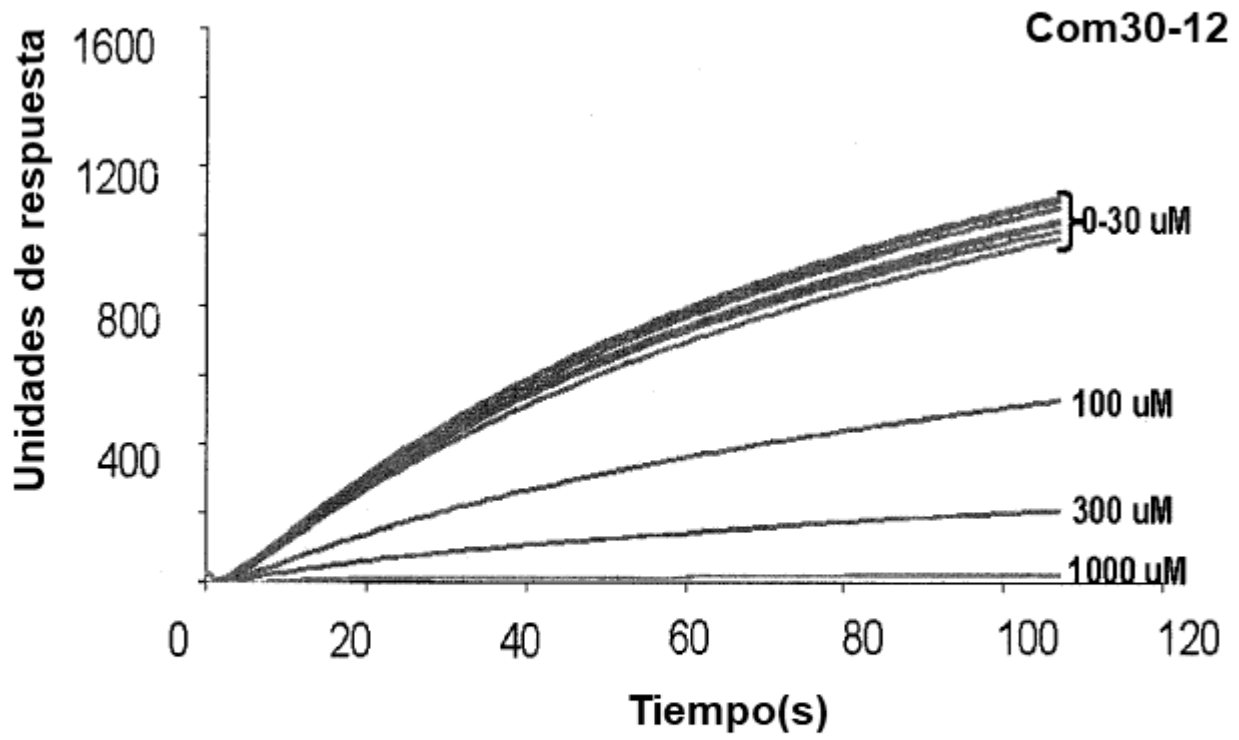


FIG. 1

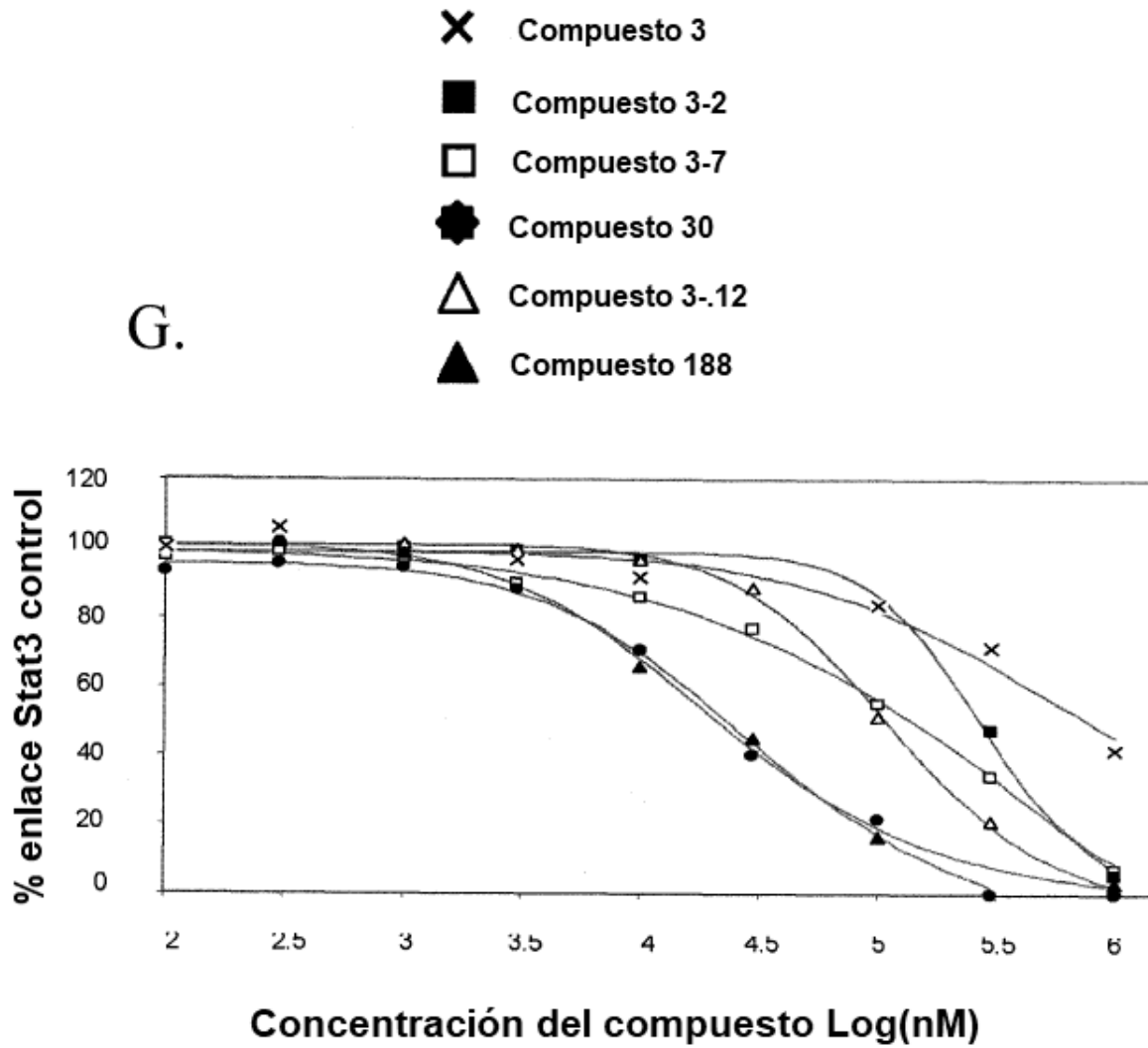
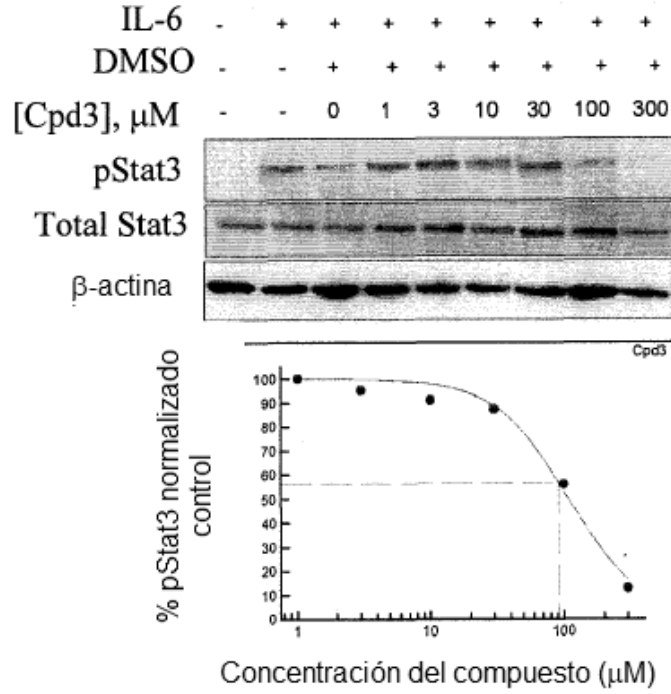


FIG. 1

A.



B.

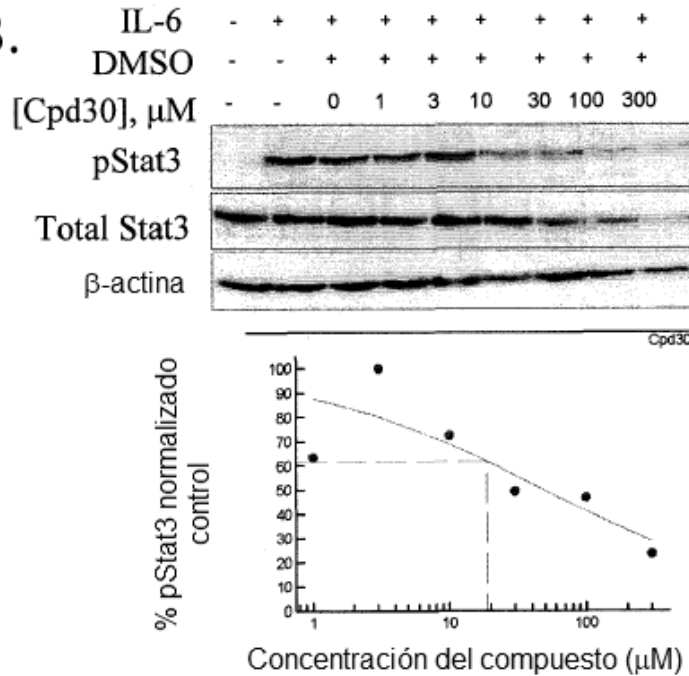
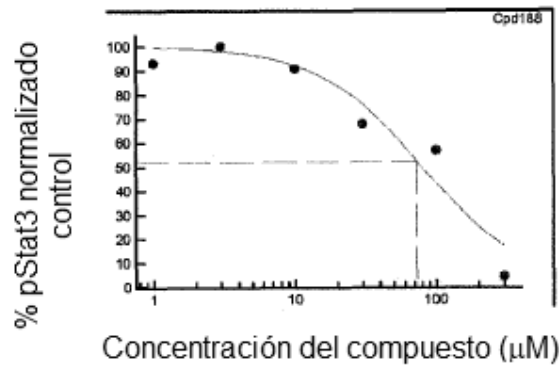
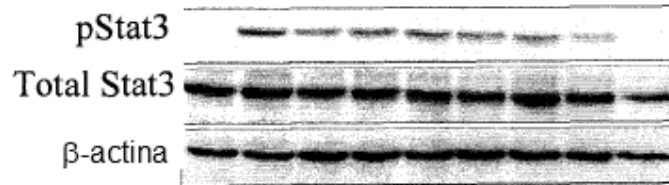


FIG. 2

C.

IL-6	-	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	-	-	+	+	+	+	+	+	+
[Cpd188], μM	-	-	0	1	3	10	30	100	300



D.

IL-6	-	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	-	-	+	+	+	+	+	+	+
[Cpd3-2], μM	-	-	0	1	3	10	30	100	300

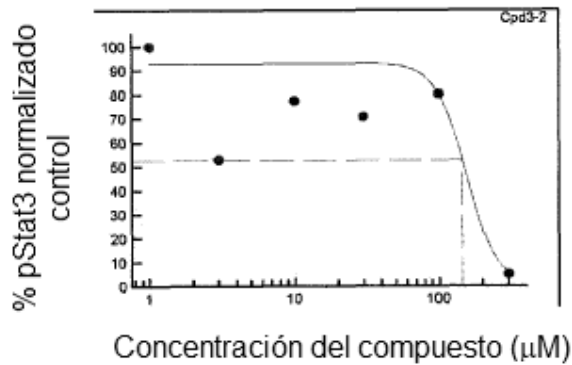
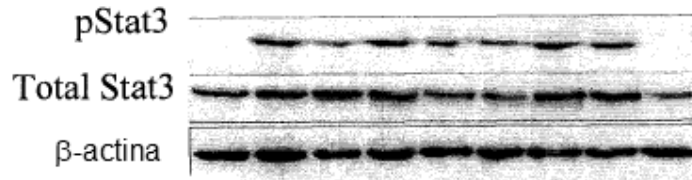
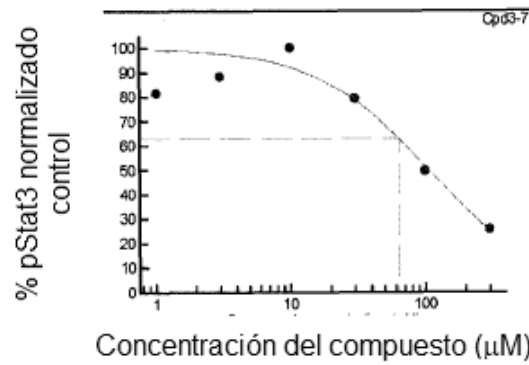
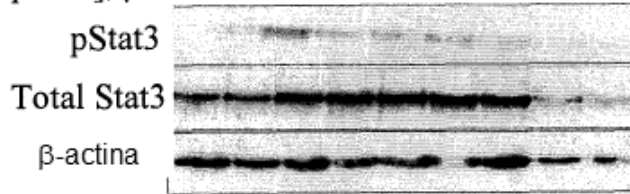


FIG. 2

E.

IL-6	-	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	-	-	+	+	+	+	+	+	+
[Cpd3-7], μM	-	-	0	1	3	10	30	100	300



F.

IL-6	-	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	-	-	+	+	+	+	+	+	+
[Cpd30-12], μM	-	-	0	1	3	10	30	100	300

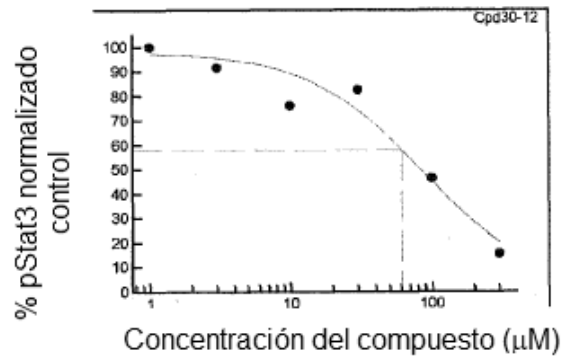
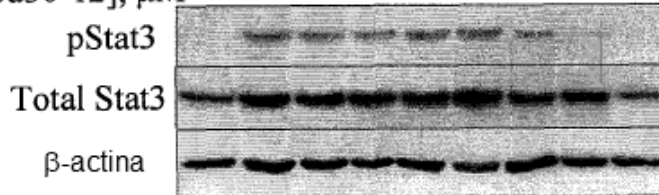
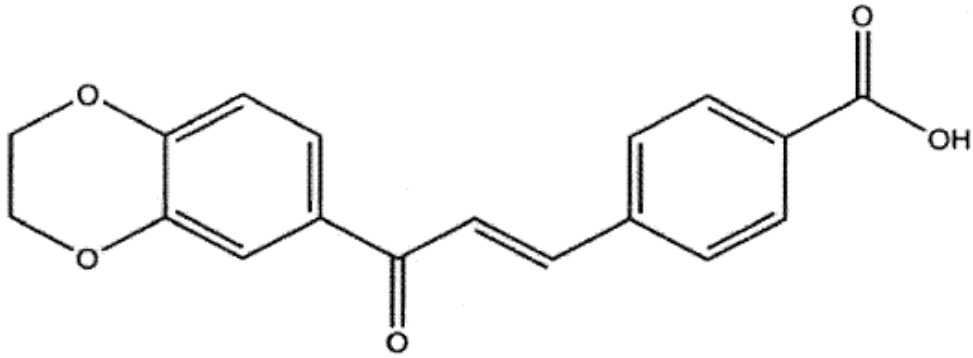


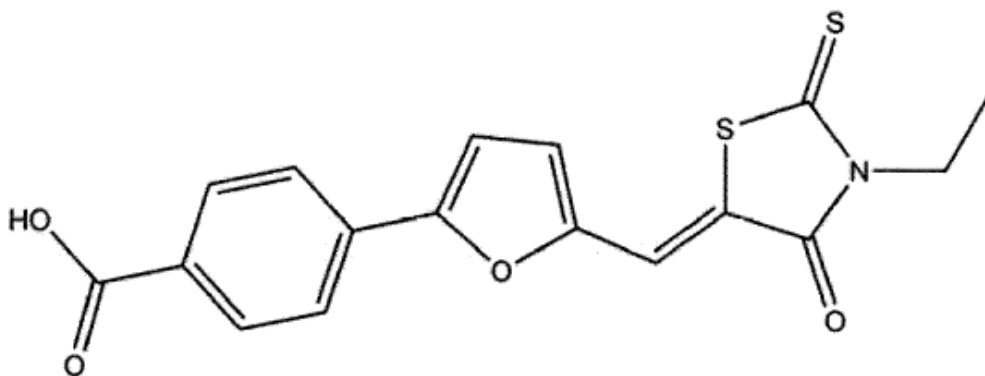
FIG. 2

A. Com3



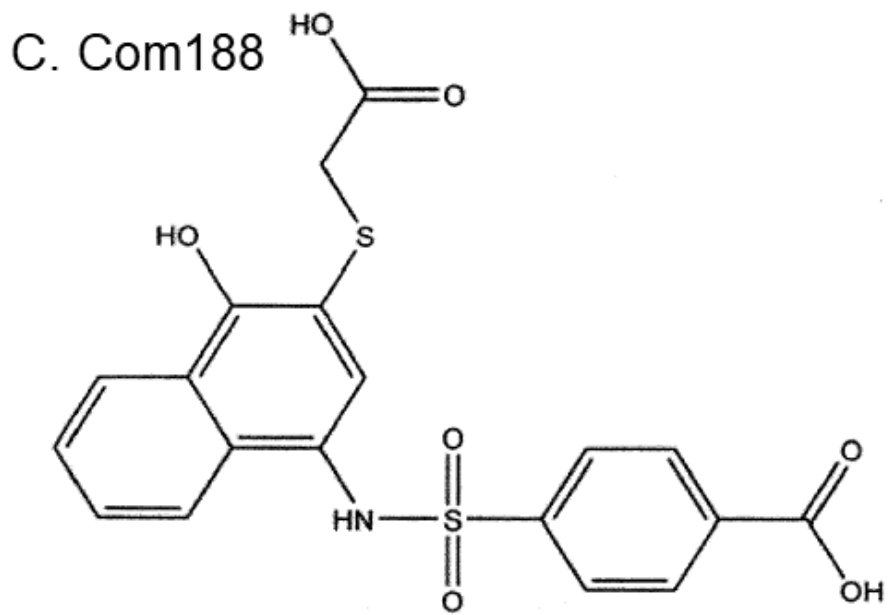
Ácido 4-[3-(2,3 dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-3-oxo-1-propen-1-il] benzoico

B. Com30



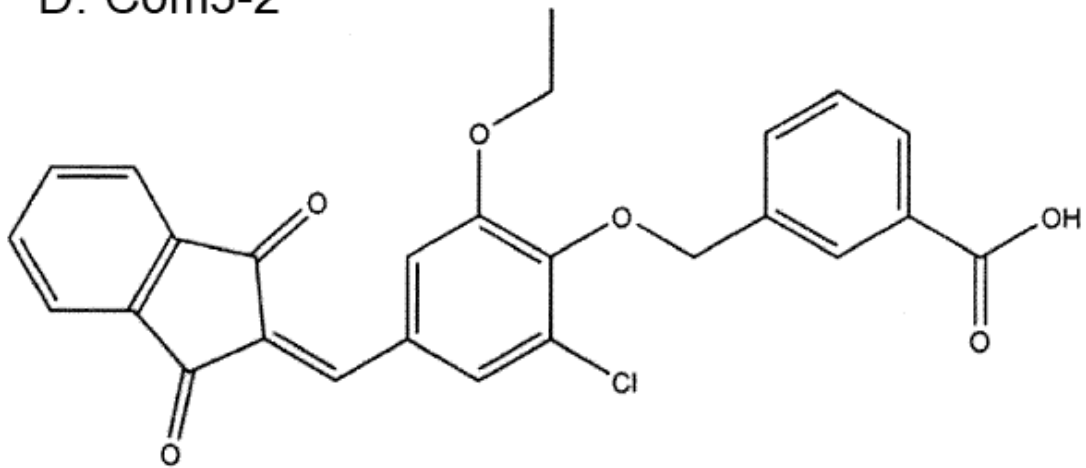
Ácido 4{5-[(3-etil-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil]-2-furil} benzoico

FIG. 3



Ácido 4-(((3-((carboximetil)tio)-4-hidroxi-1-naftil)amino)sulfonil)benzoico

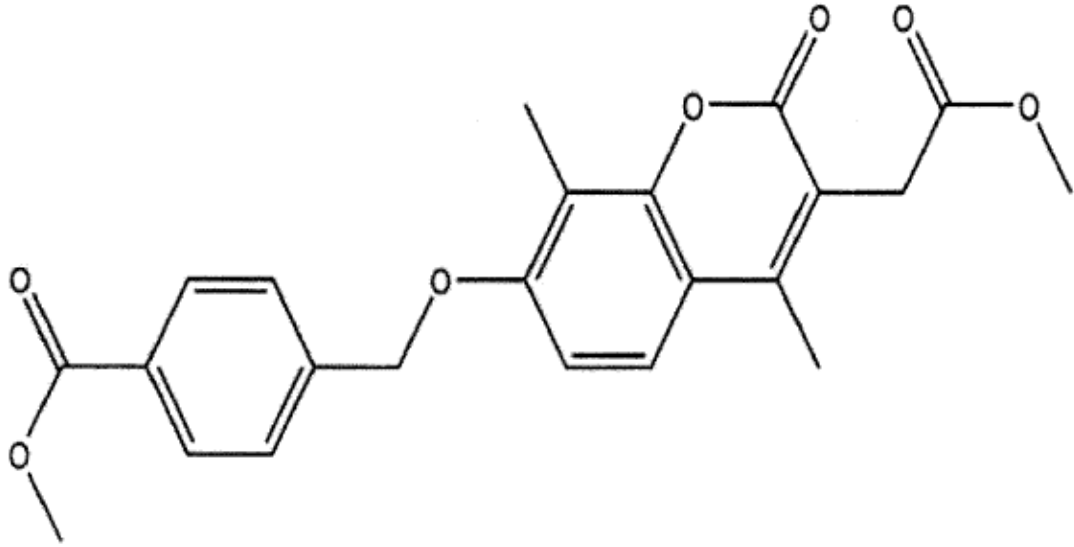
D. Com3-2



Ácido 3-((2-cloro-4-((1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-inden-2-ilideno)metil)-6-etoxifenoxi)metil)benzoico

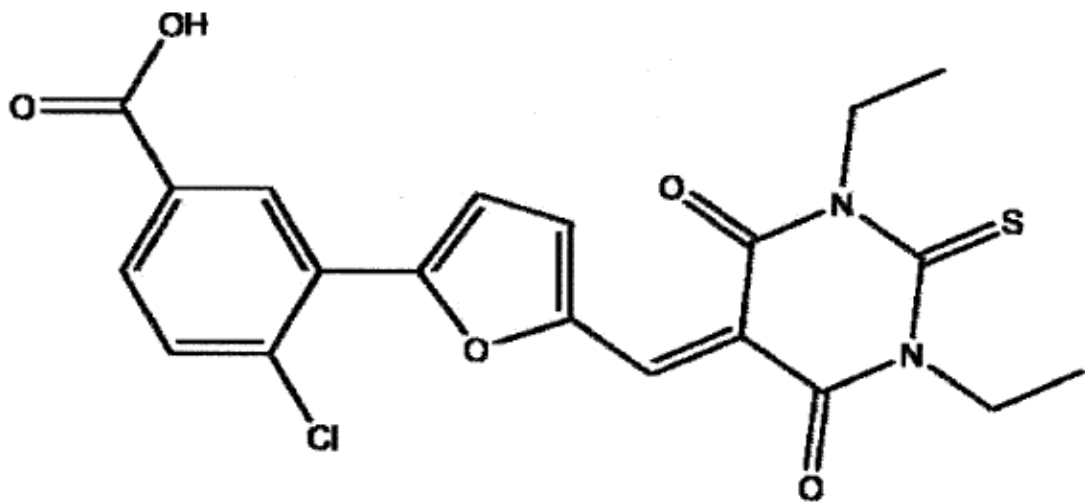
FIG. 3

E. Com3-7



Metil 4-([3-(2-metoxi-2-oxoetil)-4,8-dimetil-2-oxo-2H-cromen-7-il] oximetil) benzoato

F. Com30-12



Ácido 4-cloro-3-{5-[(1,3-dietil-4,6-dioxo-2-tioxotetrahidro-5(2H)-pirimidinilideno) metil]-2-furil}benzoico

FIG. 3

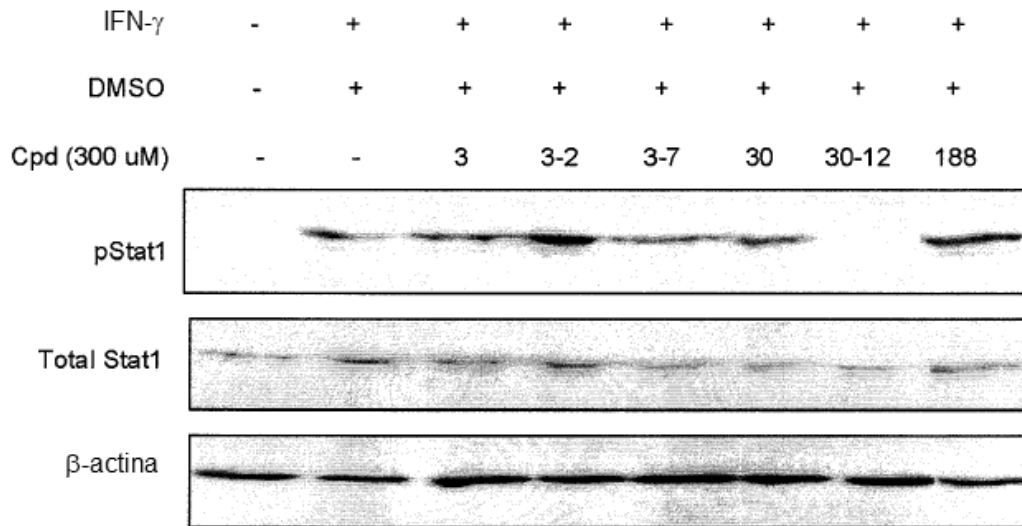


FIG. 4

A

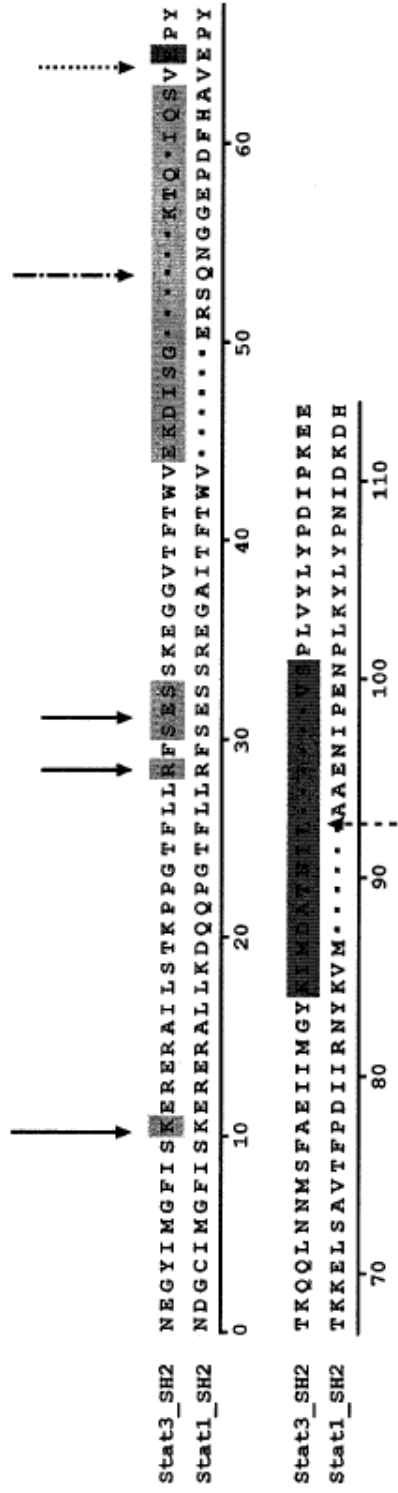


FIG. 5

B

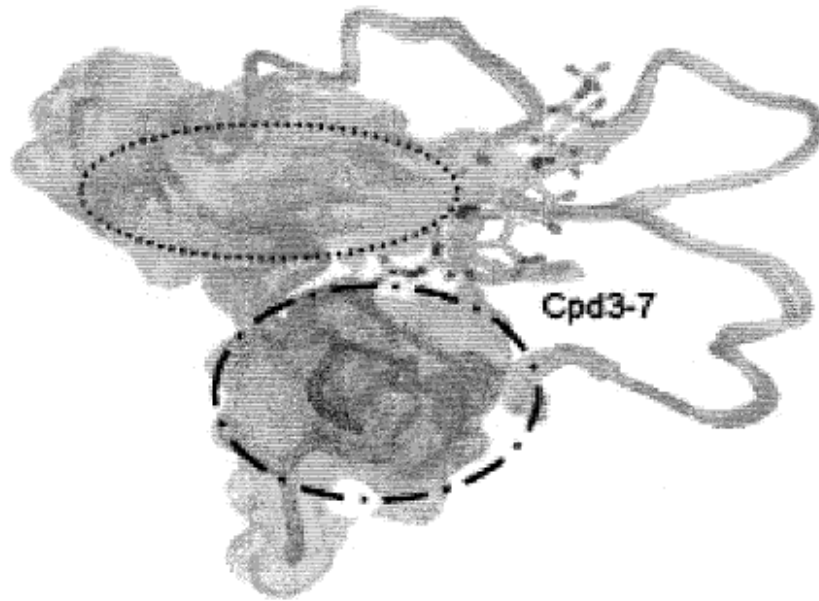


FIG. 5

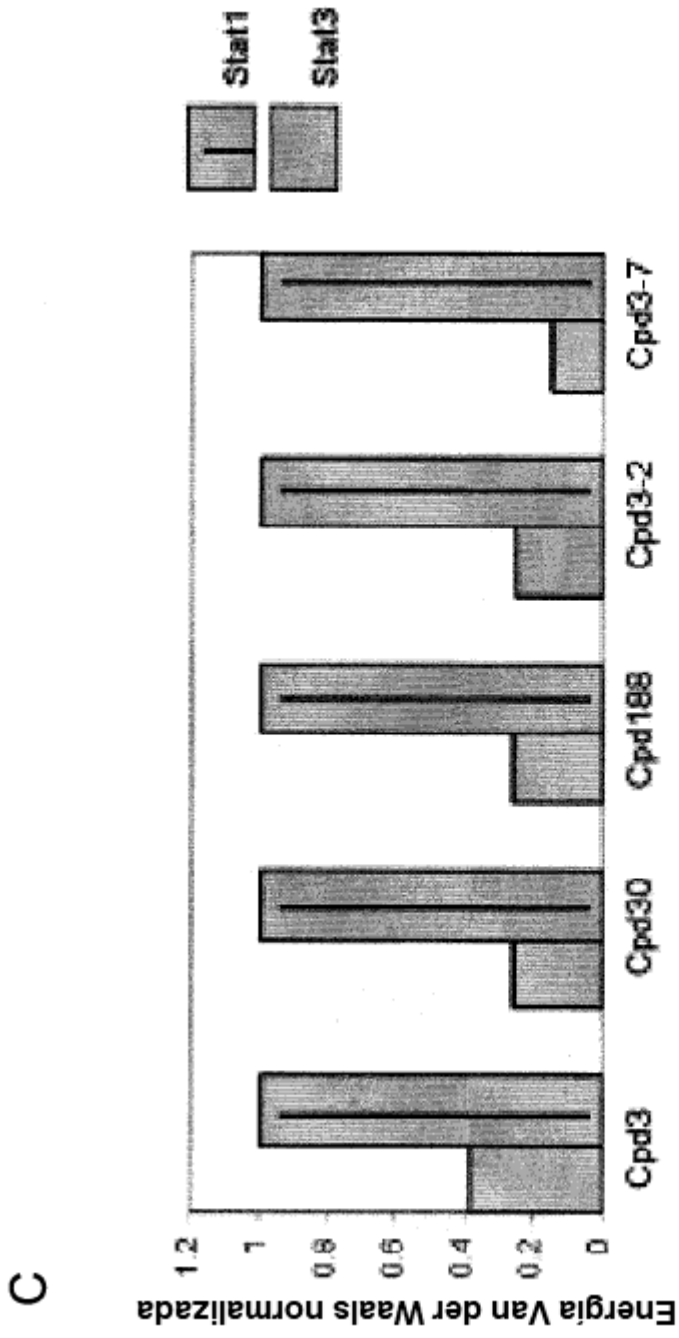


FIG. 5

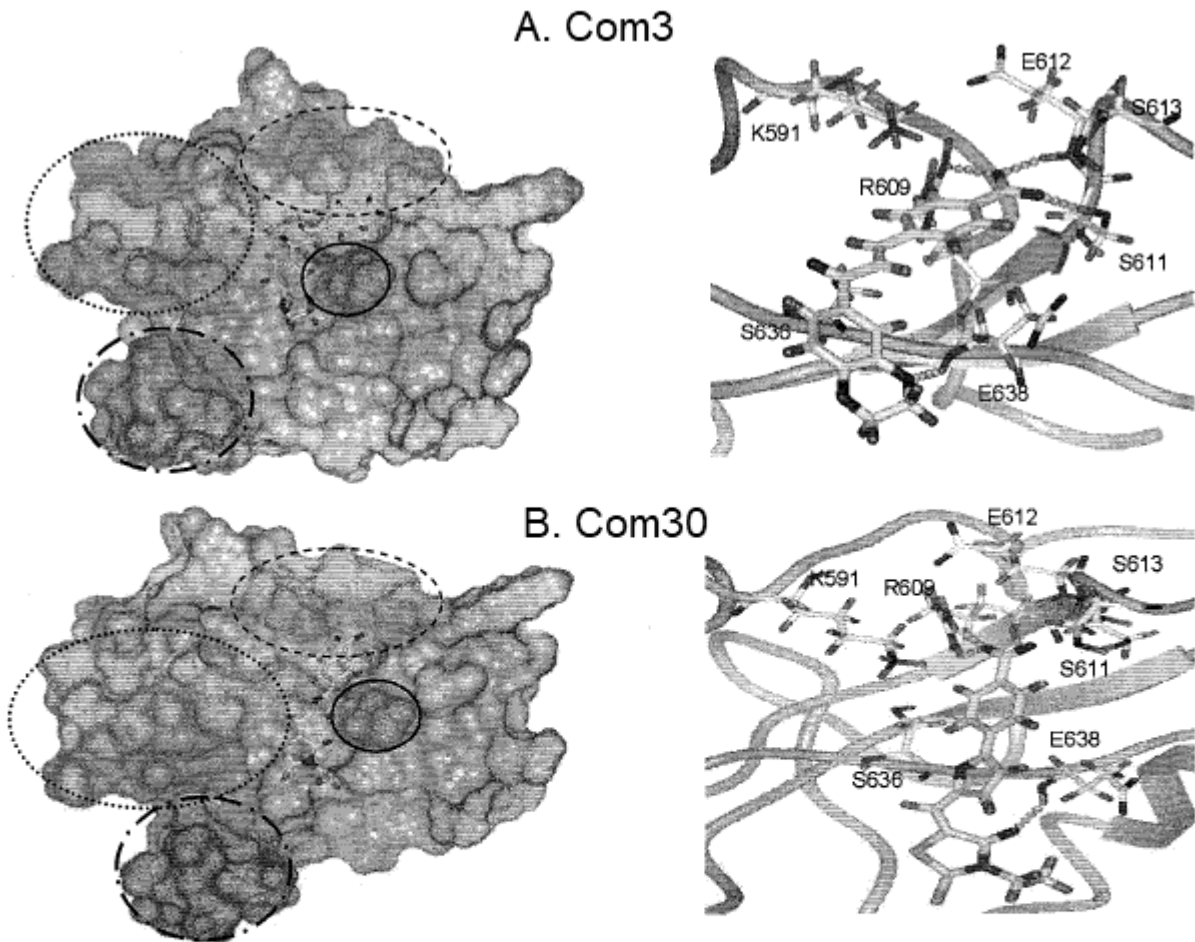
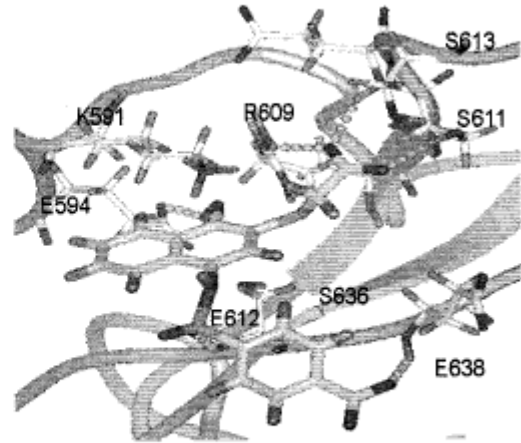
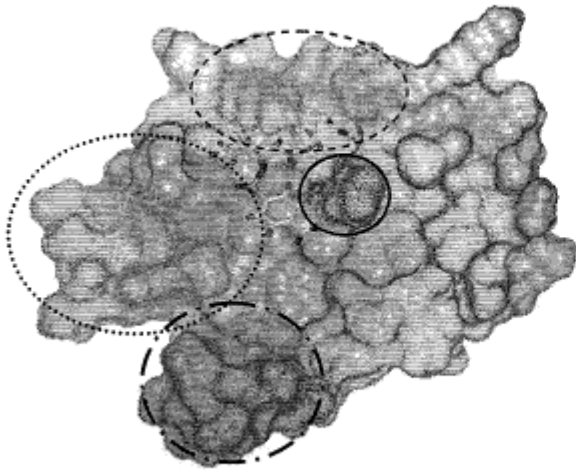


FIG. 6

C. Com188



D. Com3-2

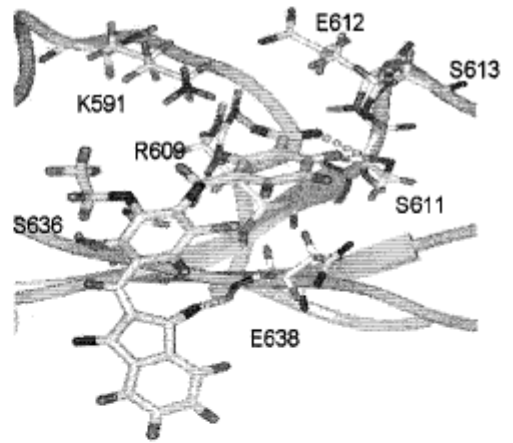
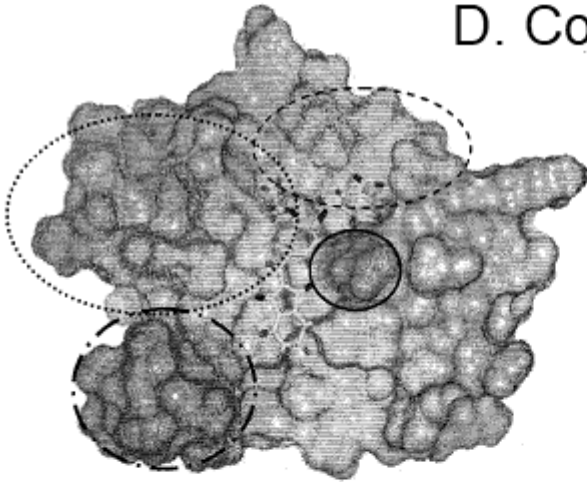


FIG. 6

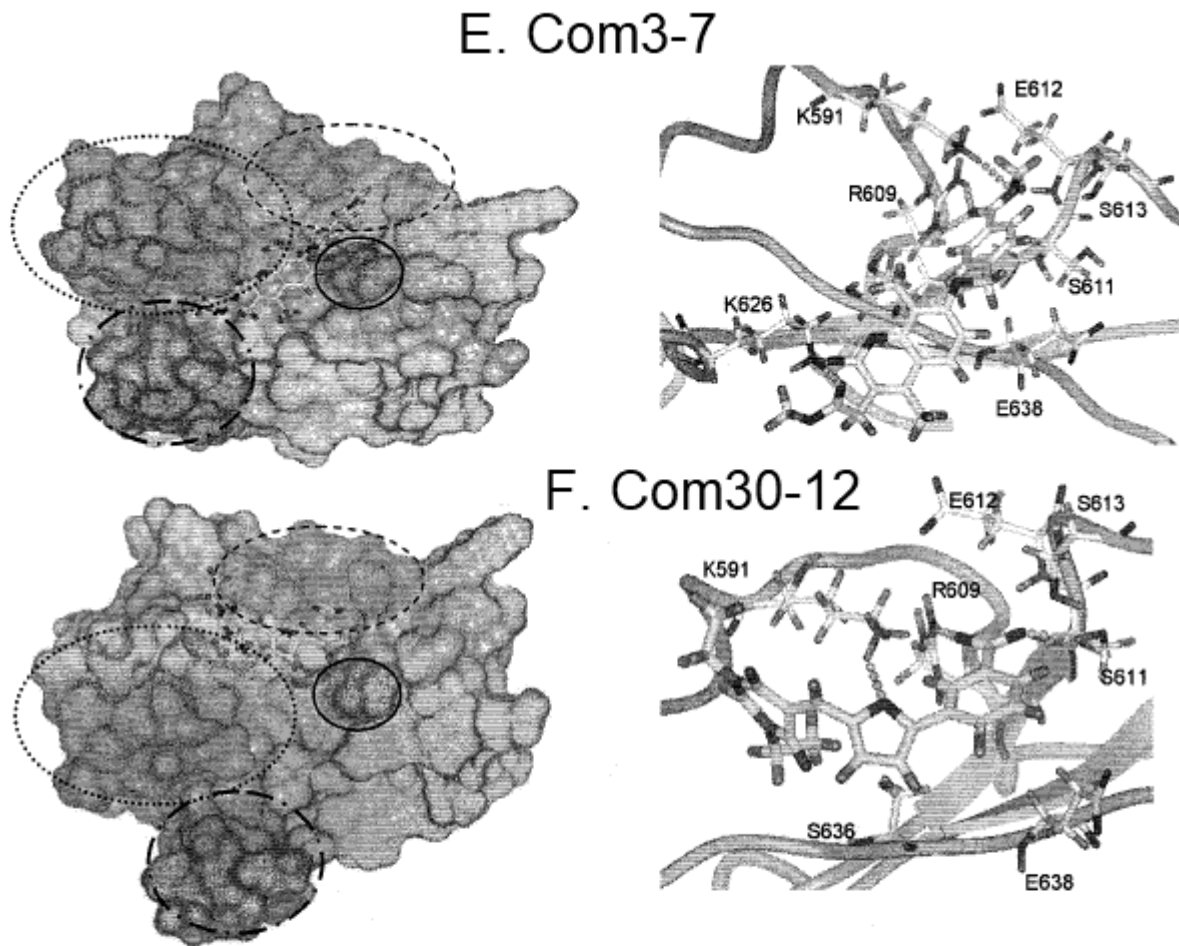


FIG. 6

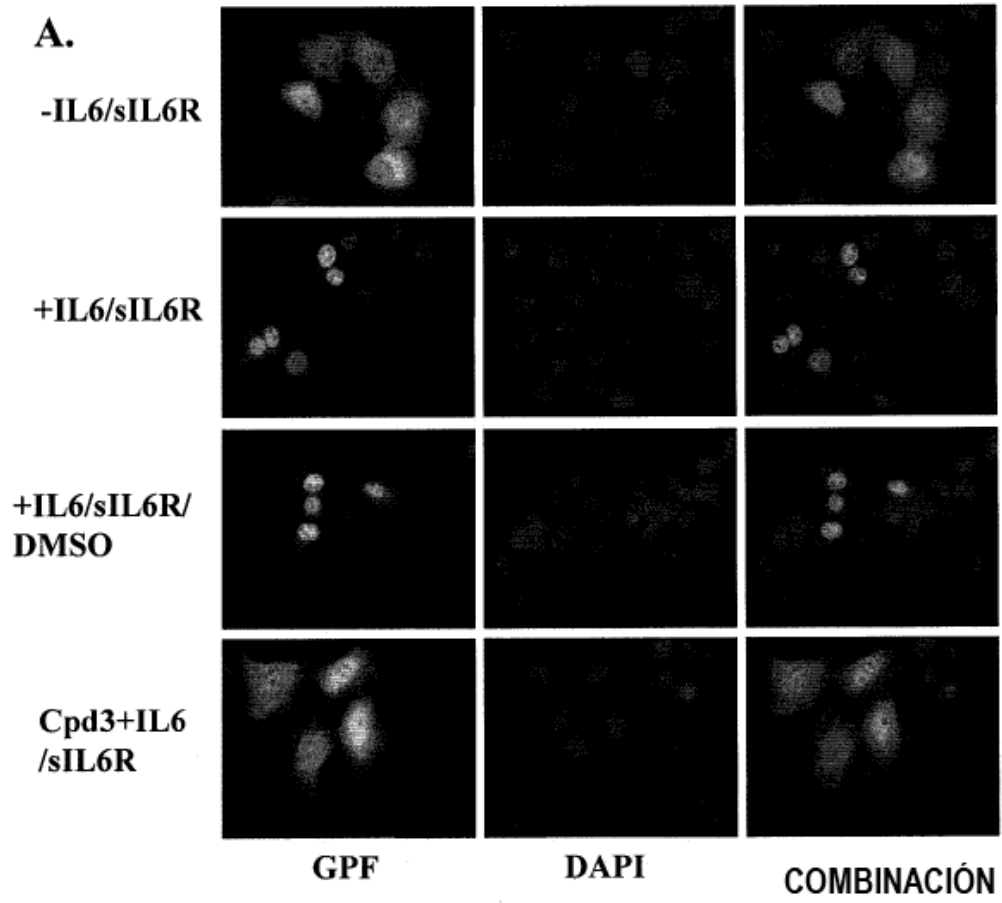


FIG. 7

B.

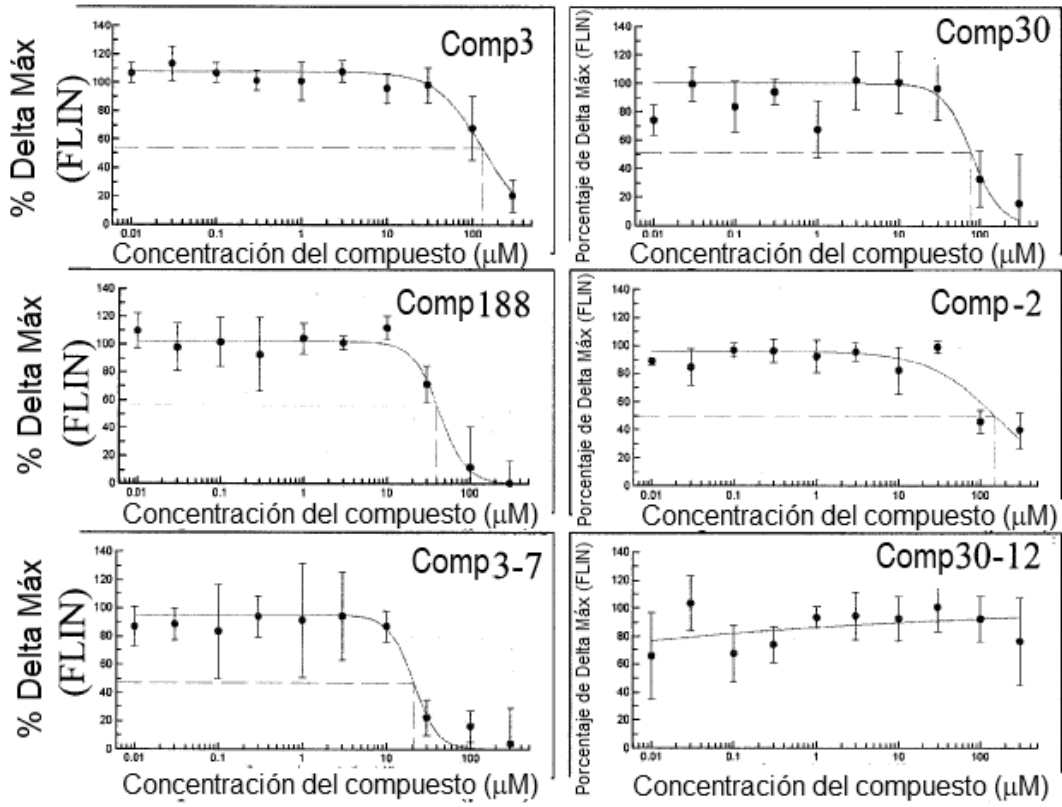


FIG. 7

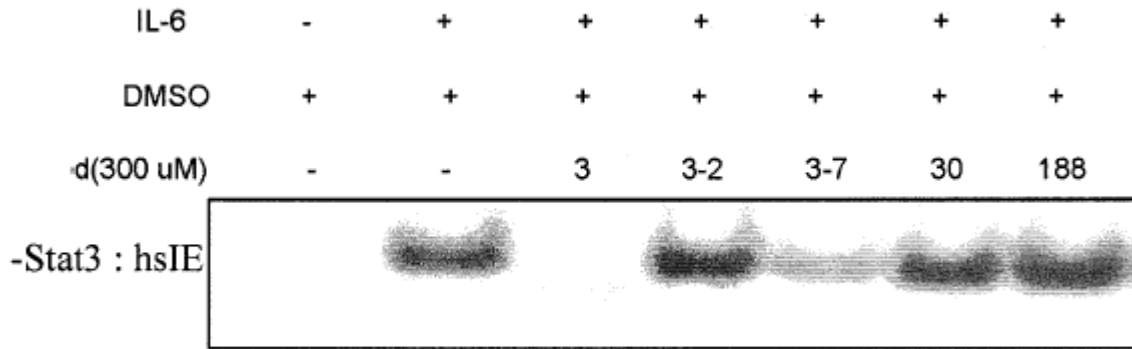


FIG. 8

A. MDA-MB-468

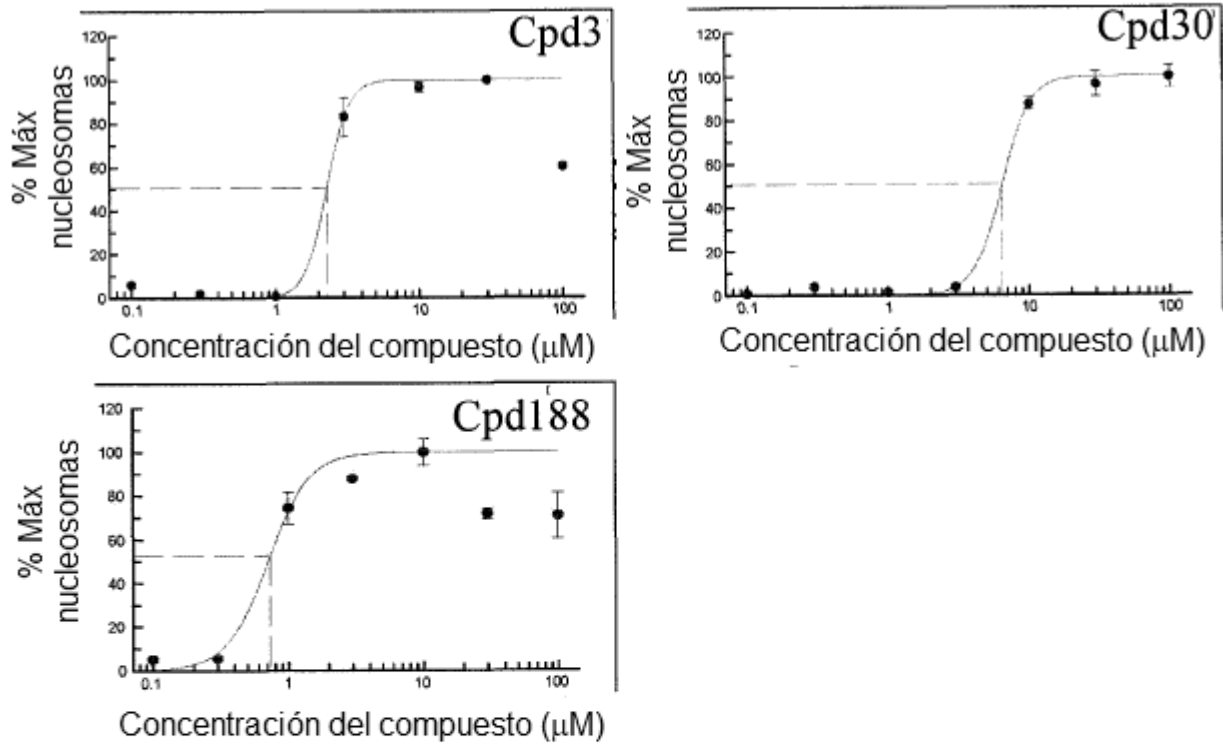


FIG. 9

B. MDA-MB-231

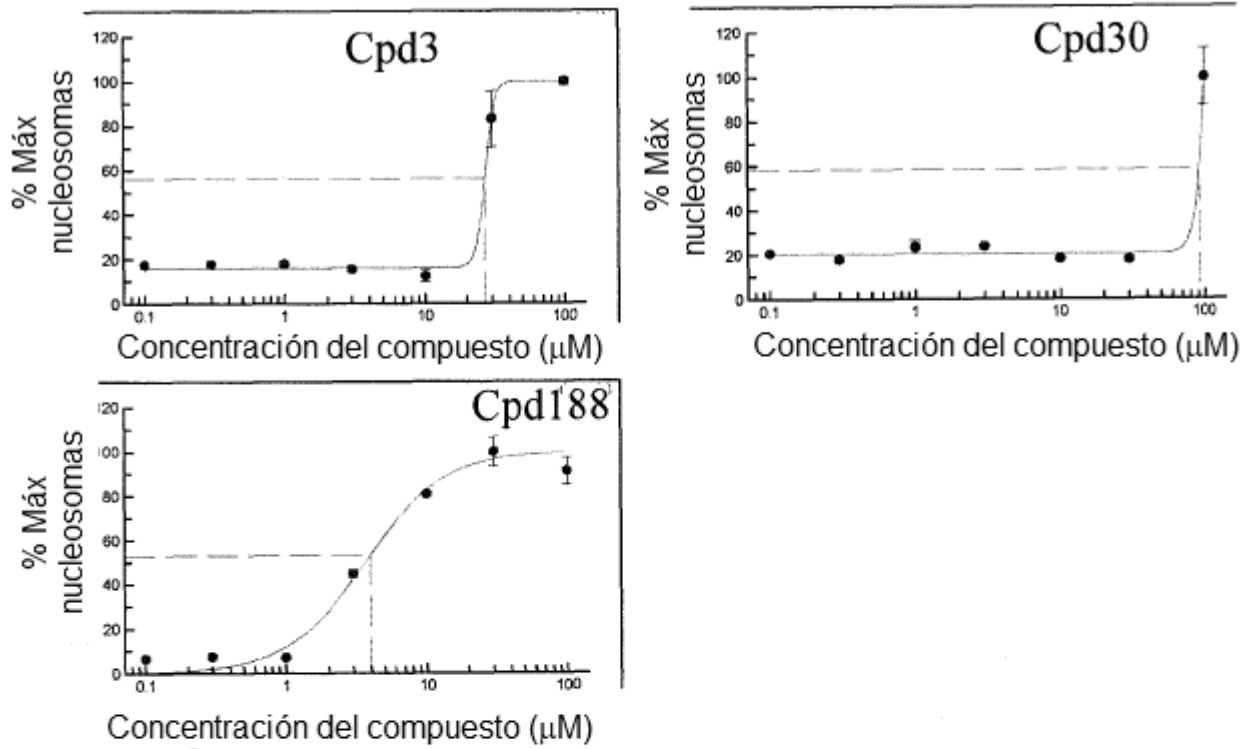


FIG. 9

C. MDA-MB-435

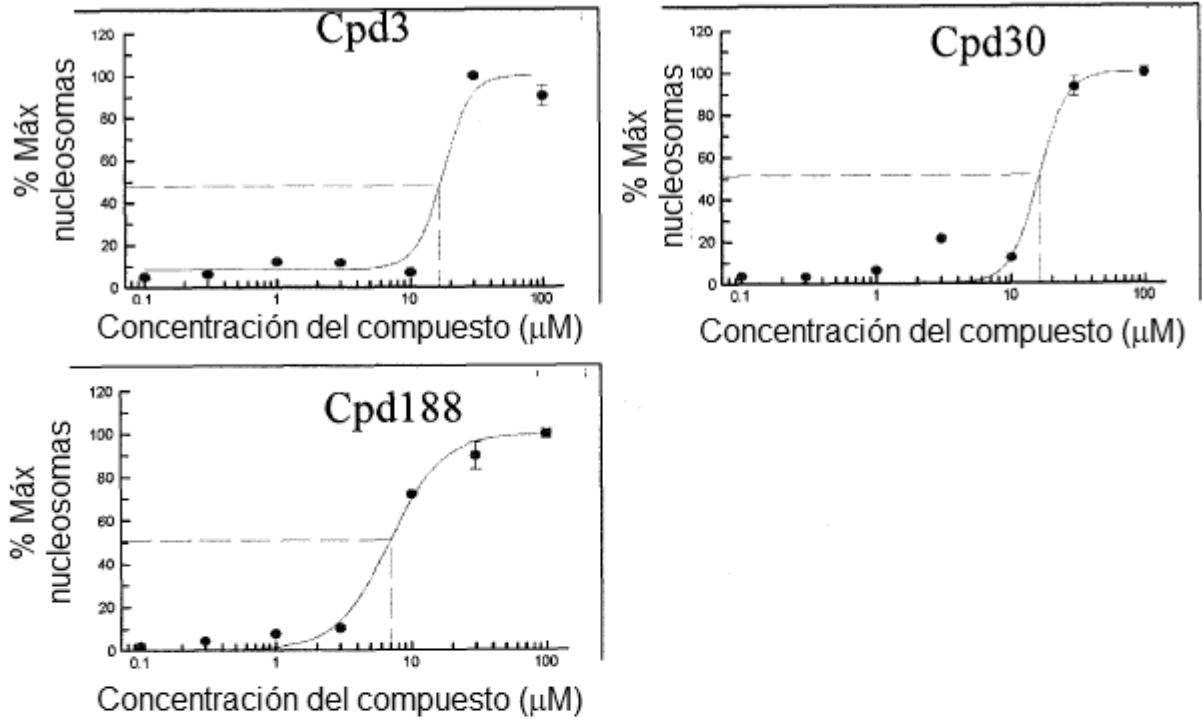


FIG. 9

D. MDA-MB-453

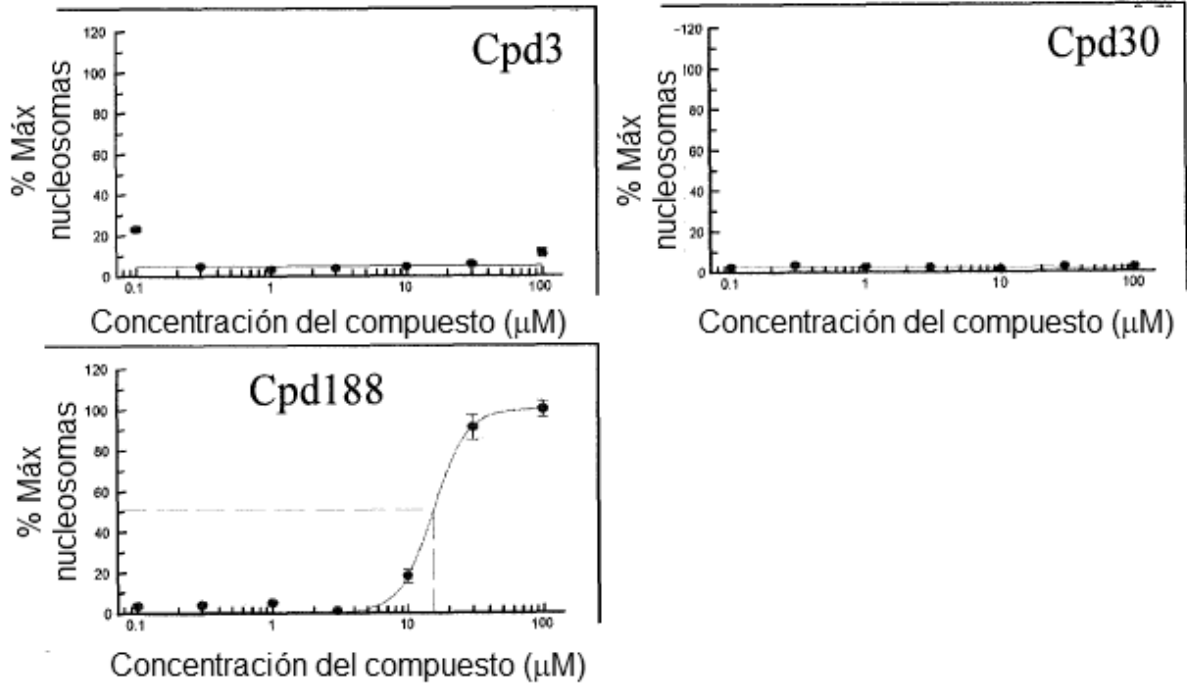


FIG. 9

E. MCF7

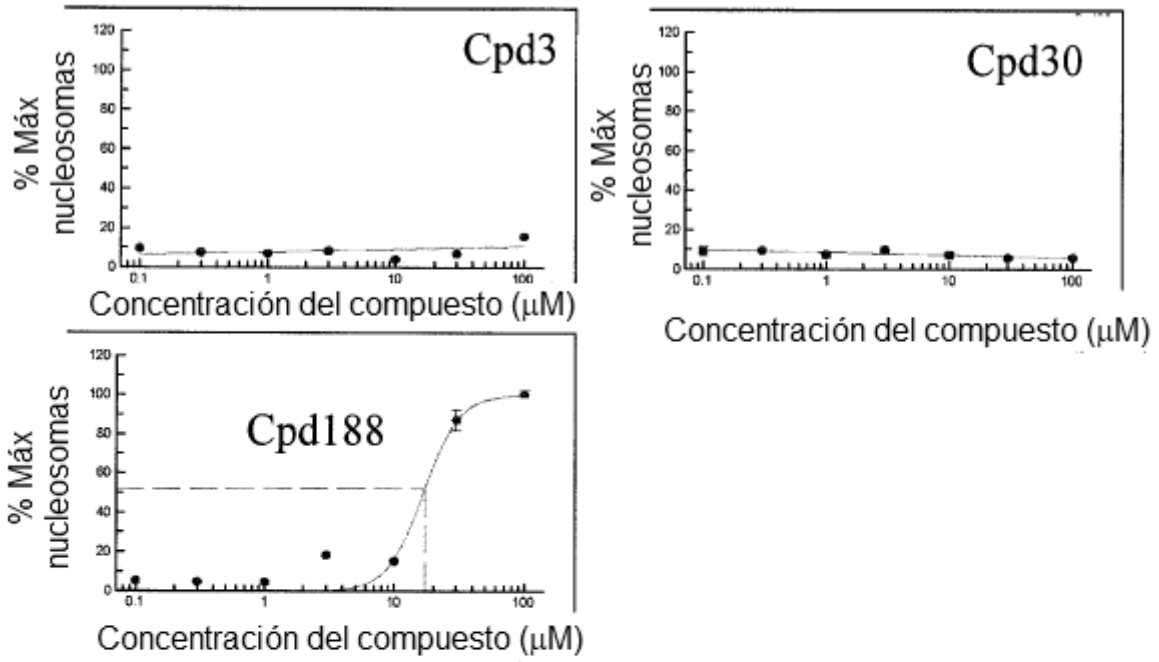


FIG. 9

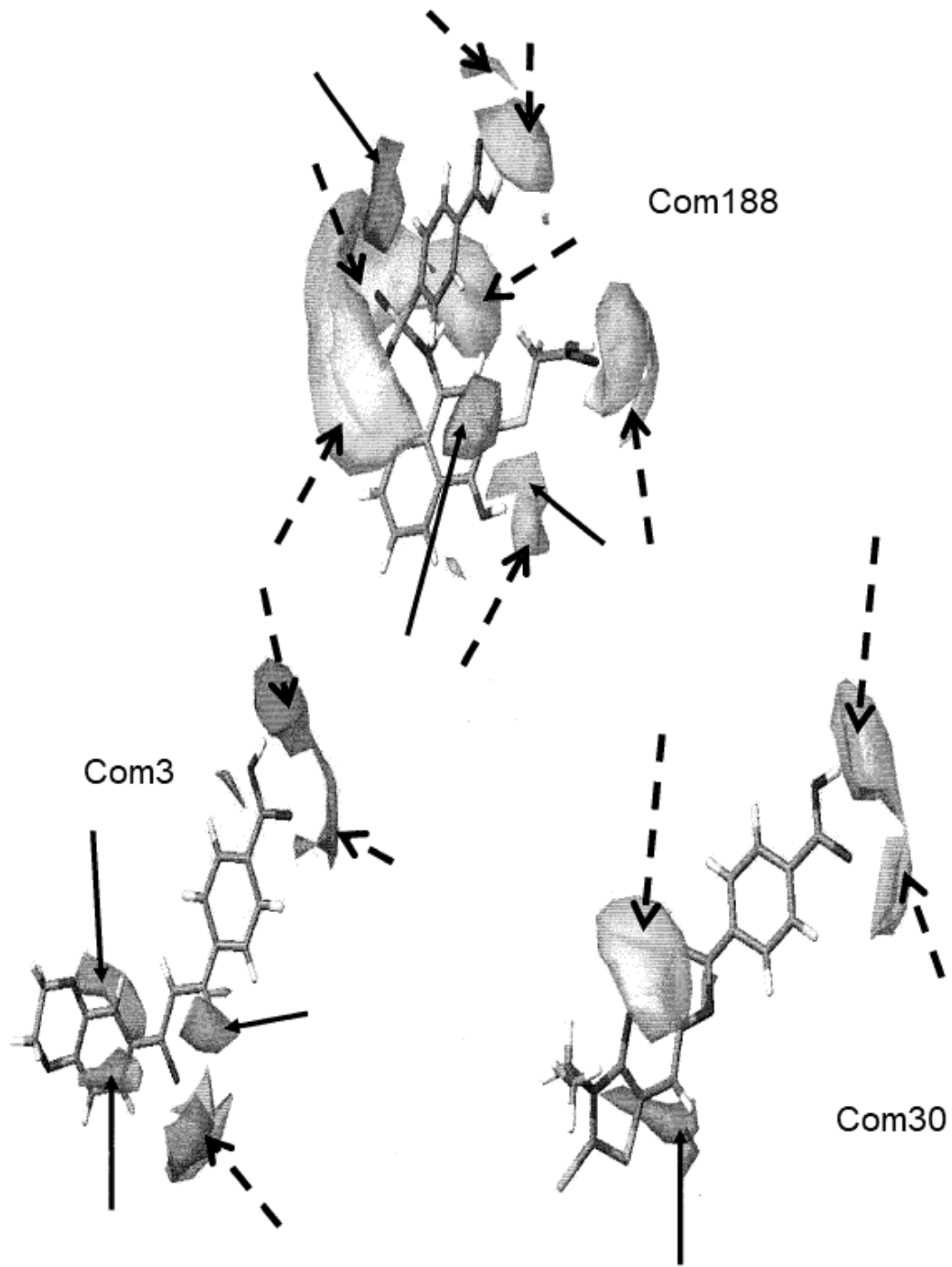
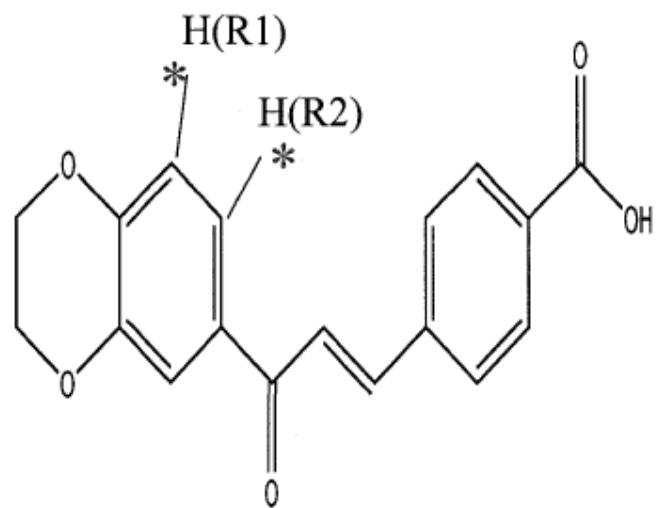
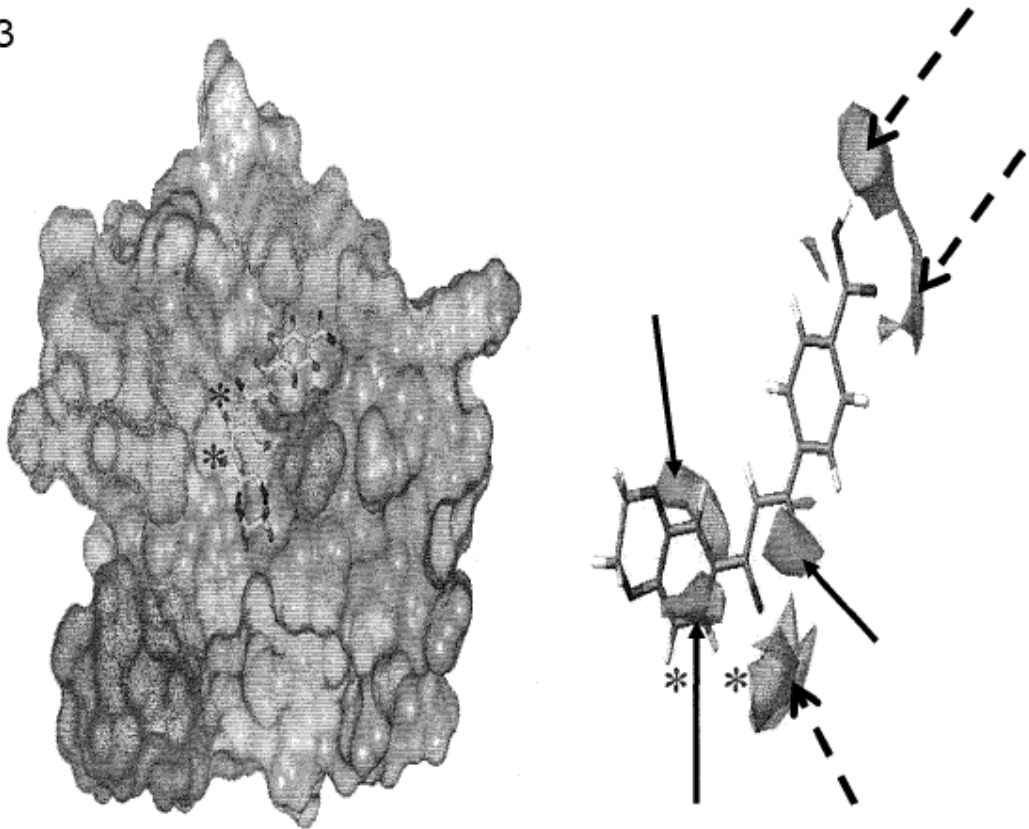


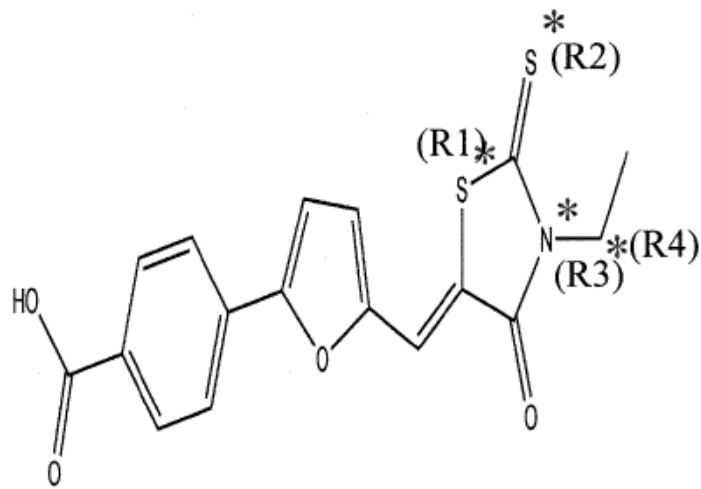
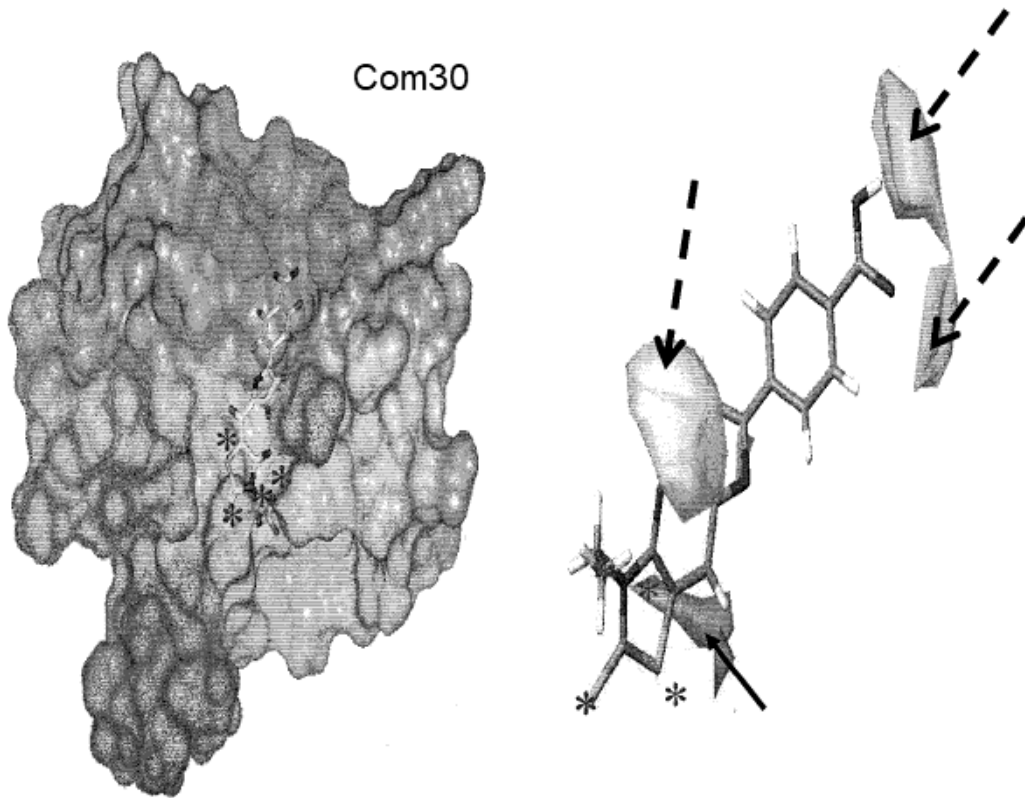
FIG. 10

Com3



Ácido 4-[3-(2,3 dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-3-oxo-1-propen-1-il] benzoico

FIG. 11



Ácido 4{5-[(3-etil-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil]-2-furil} benzoico

FIG. 12

Com188

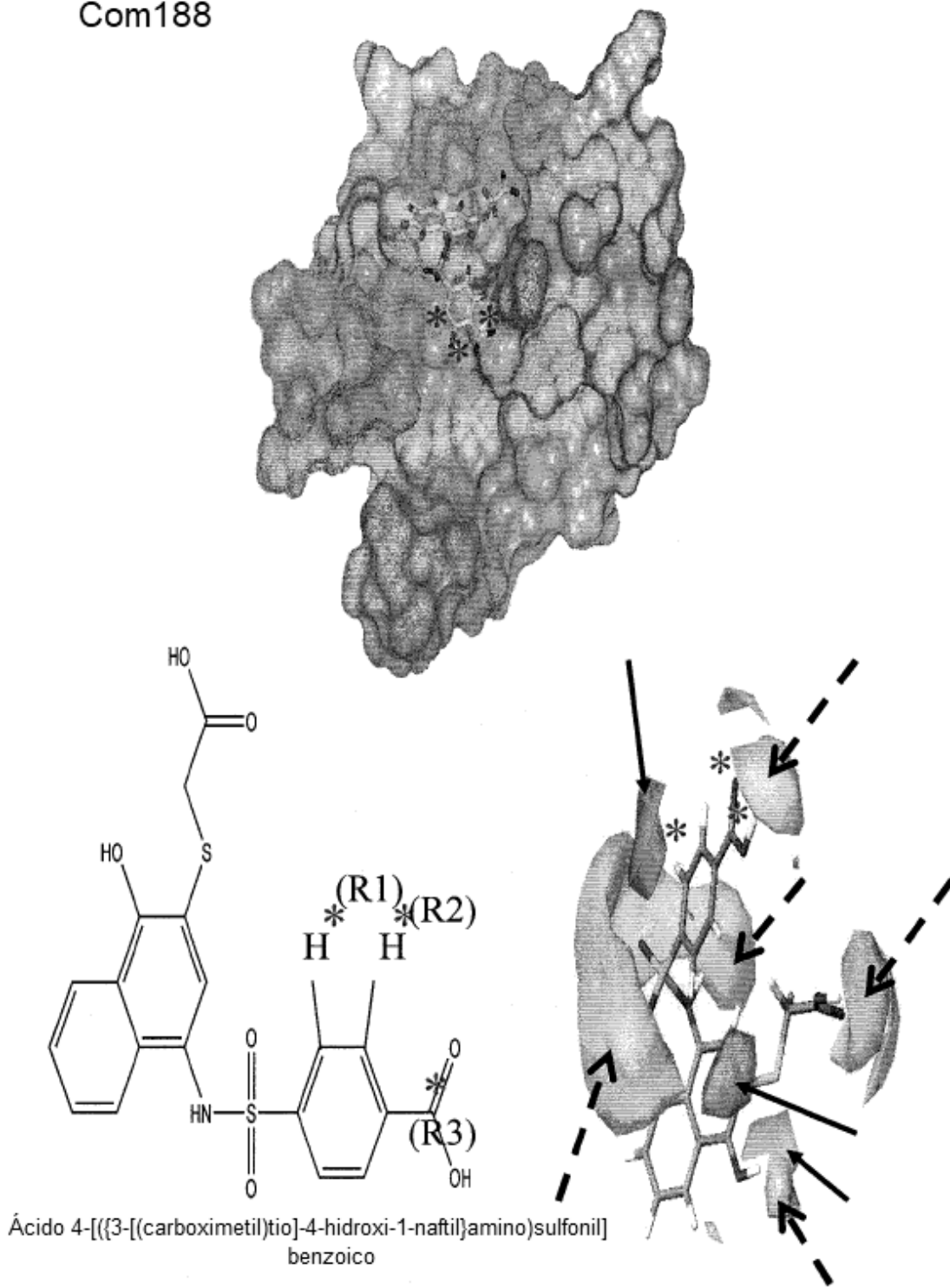


FIG. 13

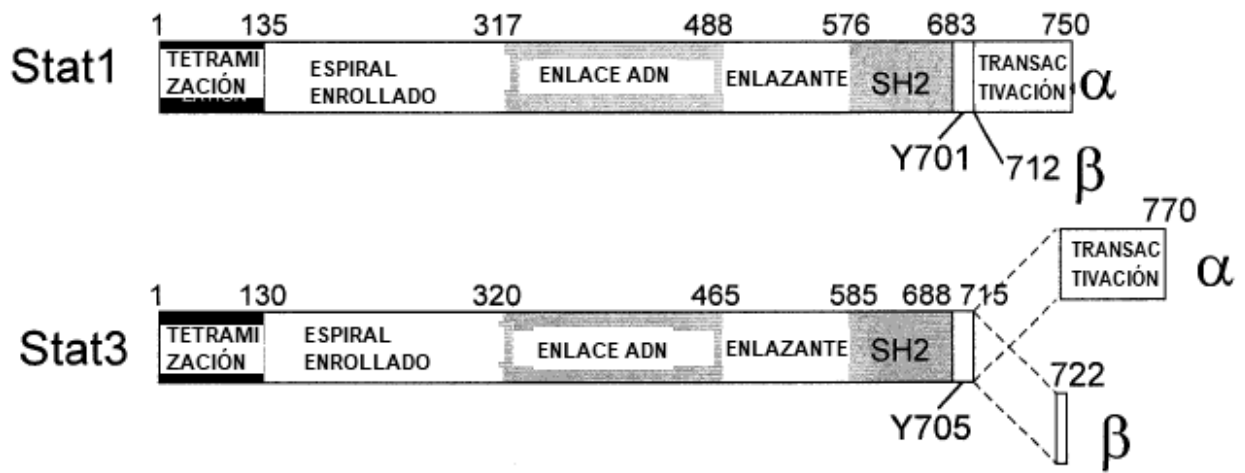


FIG. 14

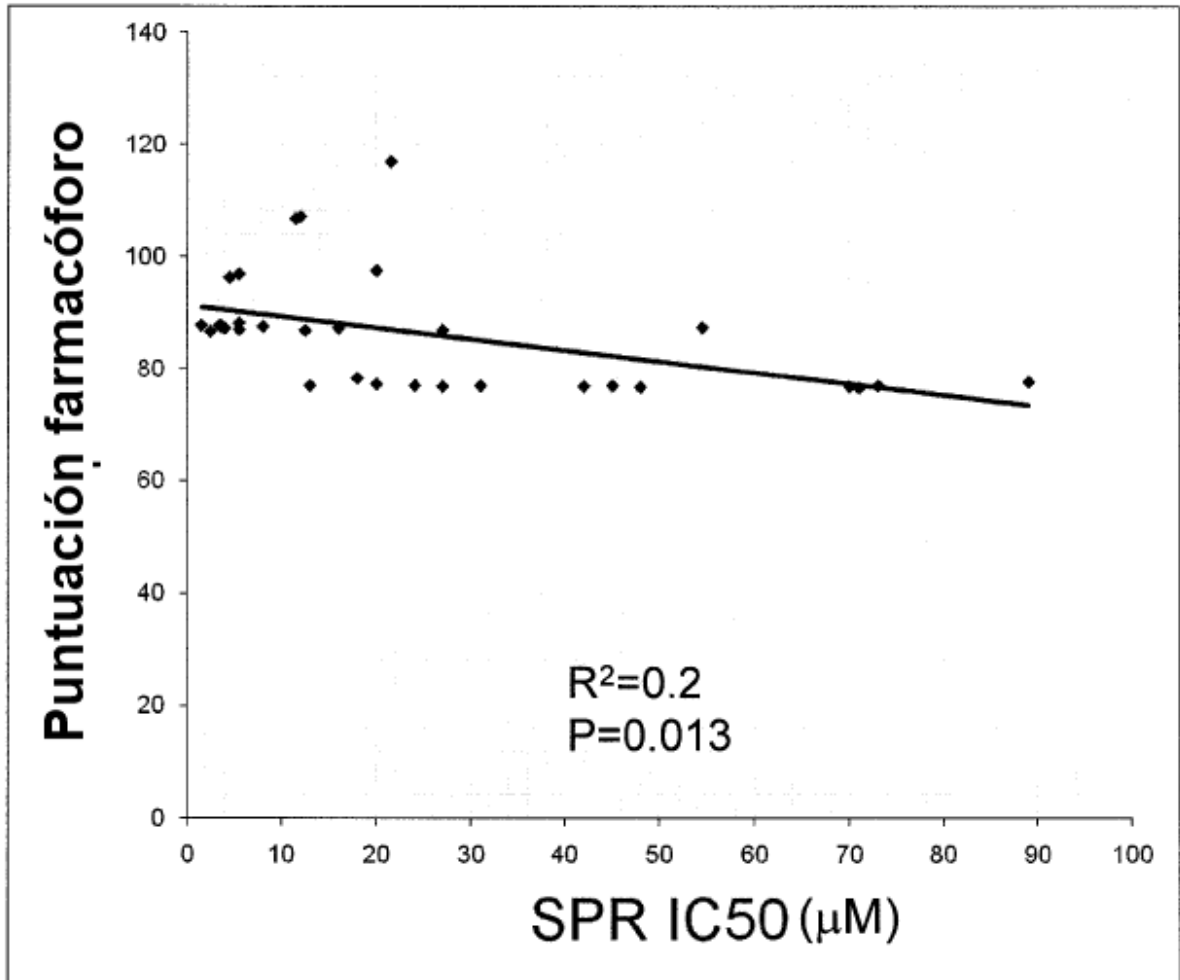


FIG. 15

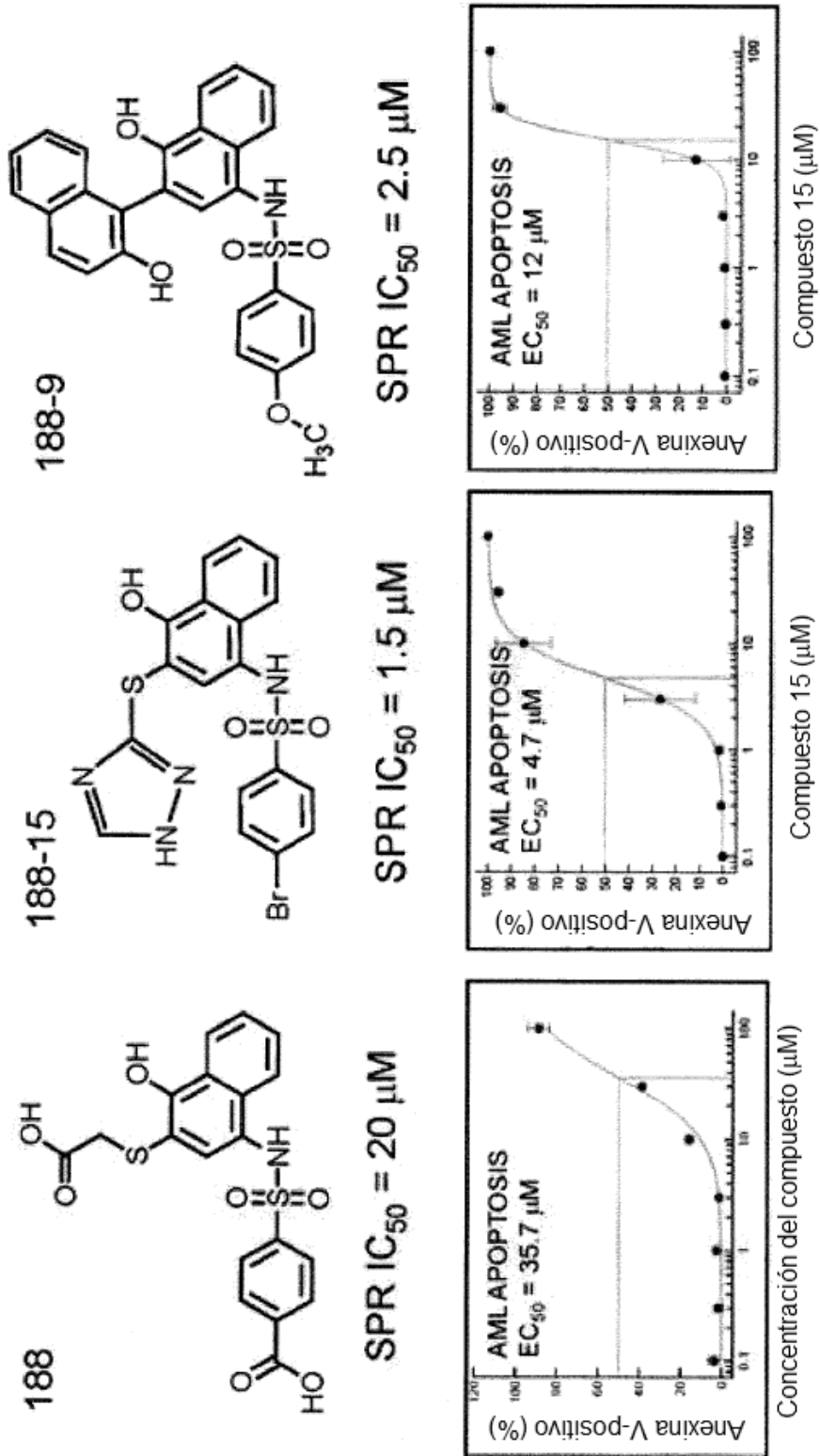


FIG. 16

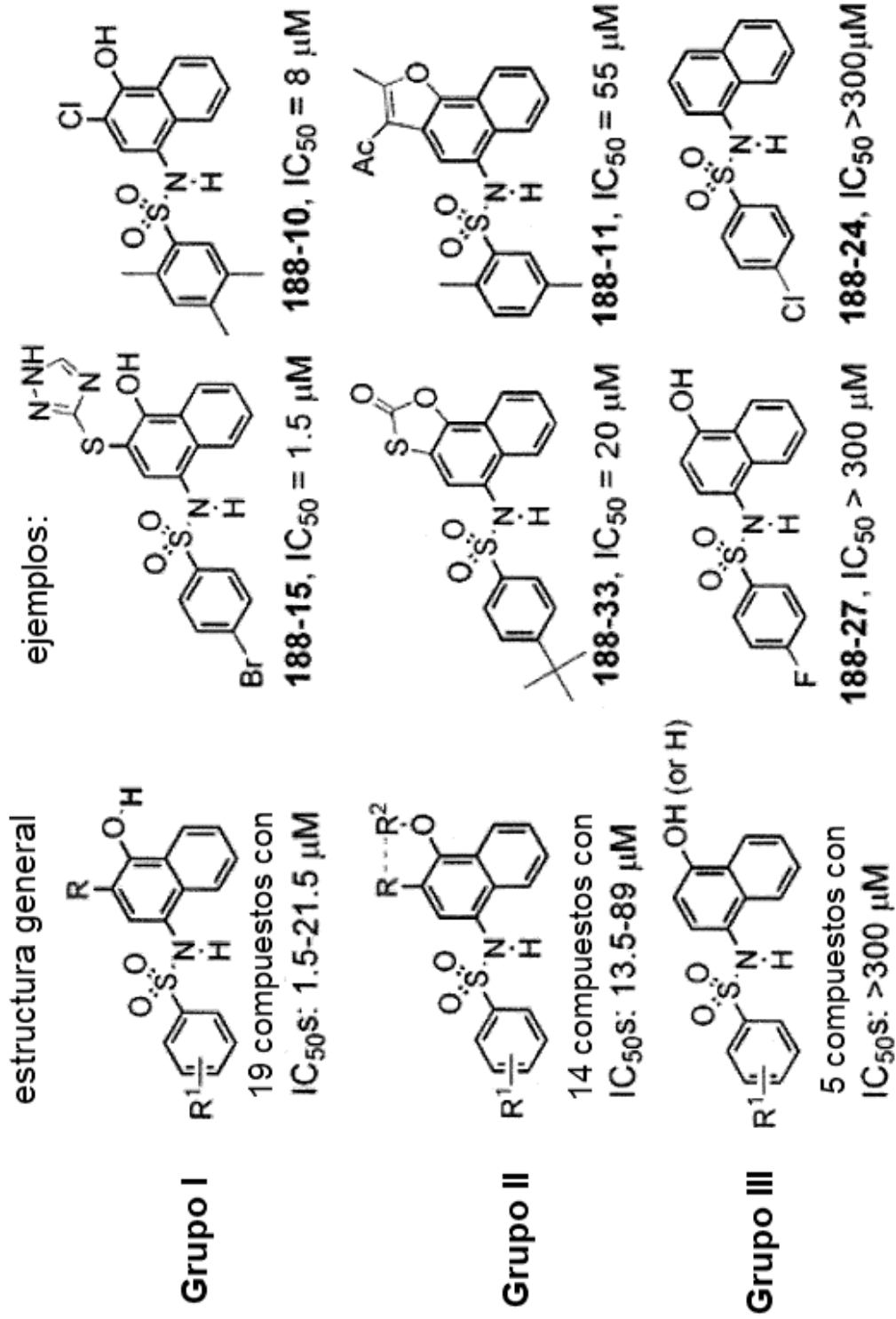


FIG. 17

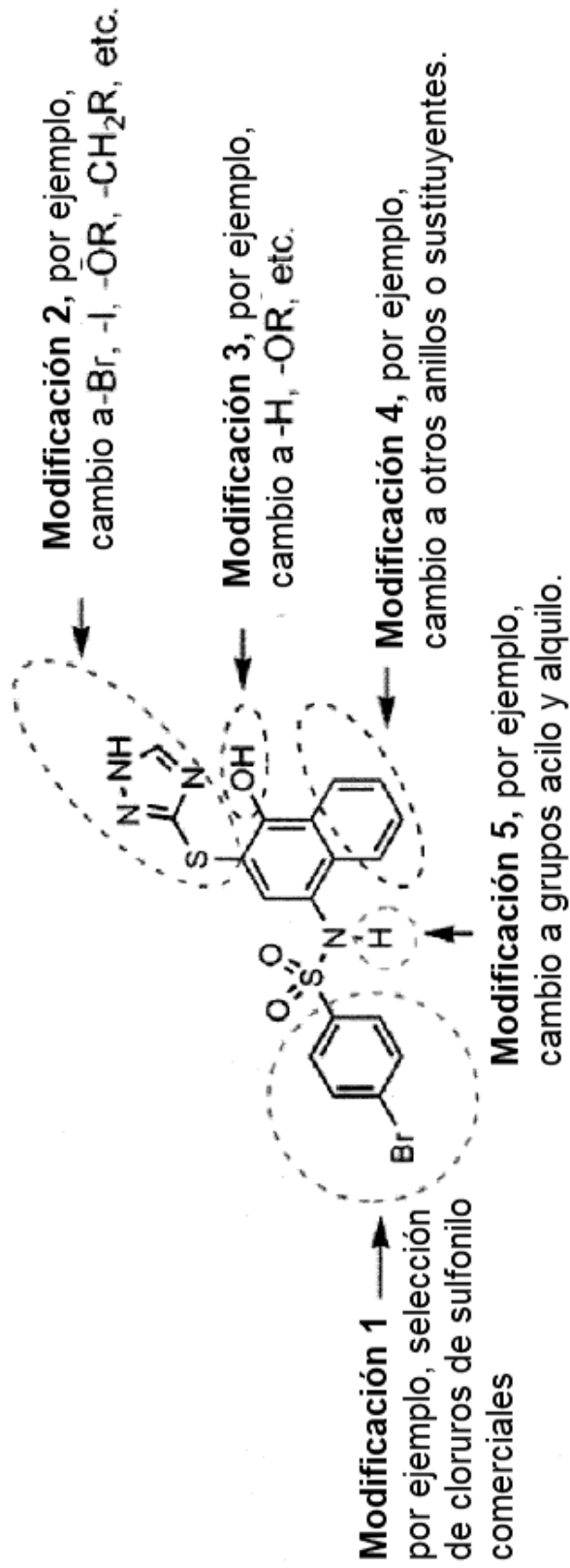


FIG. 18

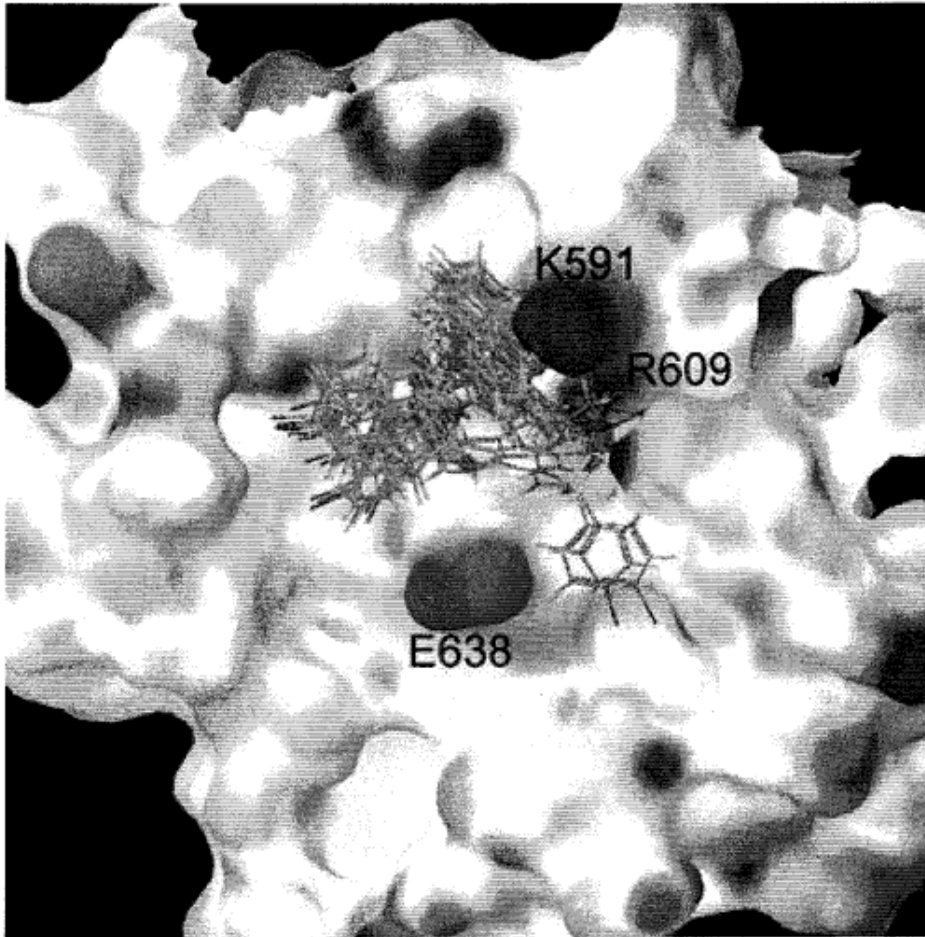


FIG. 19

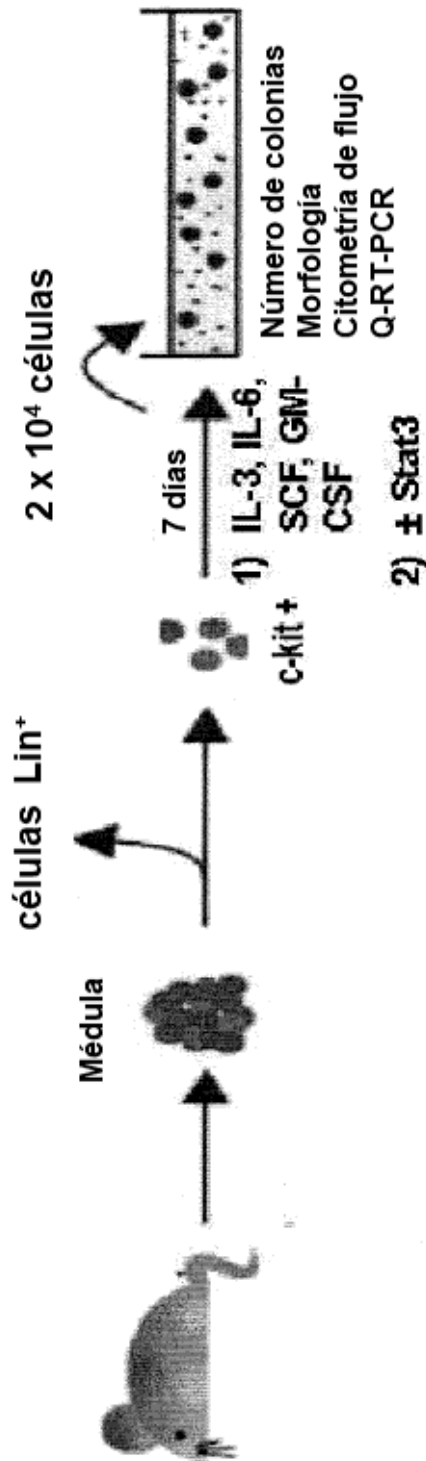


FIG. 20

- pMSCV-neo
- pMSCV-puro
- pMSCV-puro-PML-RAR α
- pMSCV-puro-PLZF-RAR α
- pMSCV-neo-Stat5b-RAR α
- pMSCV-puro-R1A-RAR α
- pMSCV-puro-R1A-RAR α - RII
- pMSCV-neo AML1-ETO
- pMSCV-neo-AML1-MTG16
- pMSCV-neo-AML1-EVI1
- pMSCV-puro M2-CBF β -MYH11
- pMSCV-puro-HIF1 α -AML1
- pMSCV-puroTEL-AML1

FIG. 21

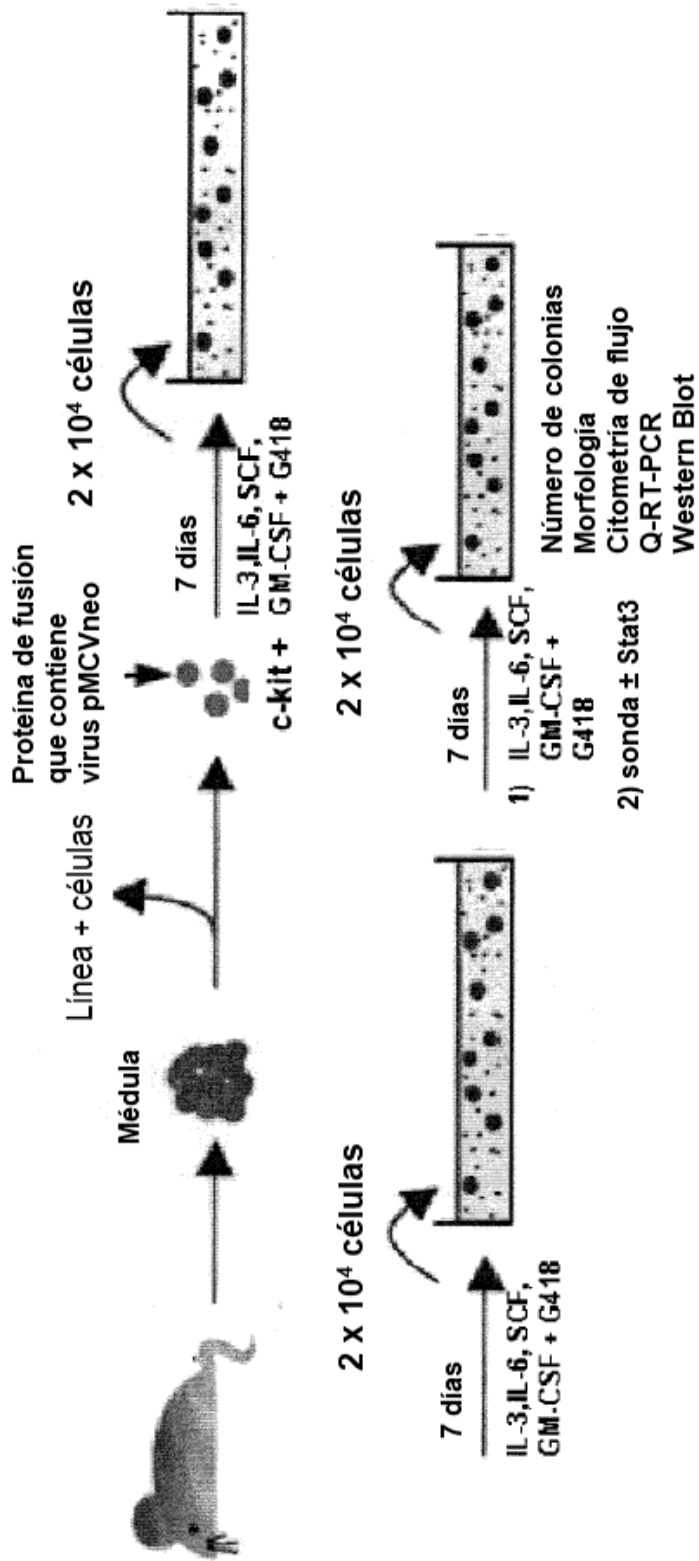


FIG. 22

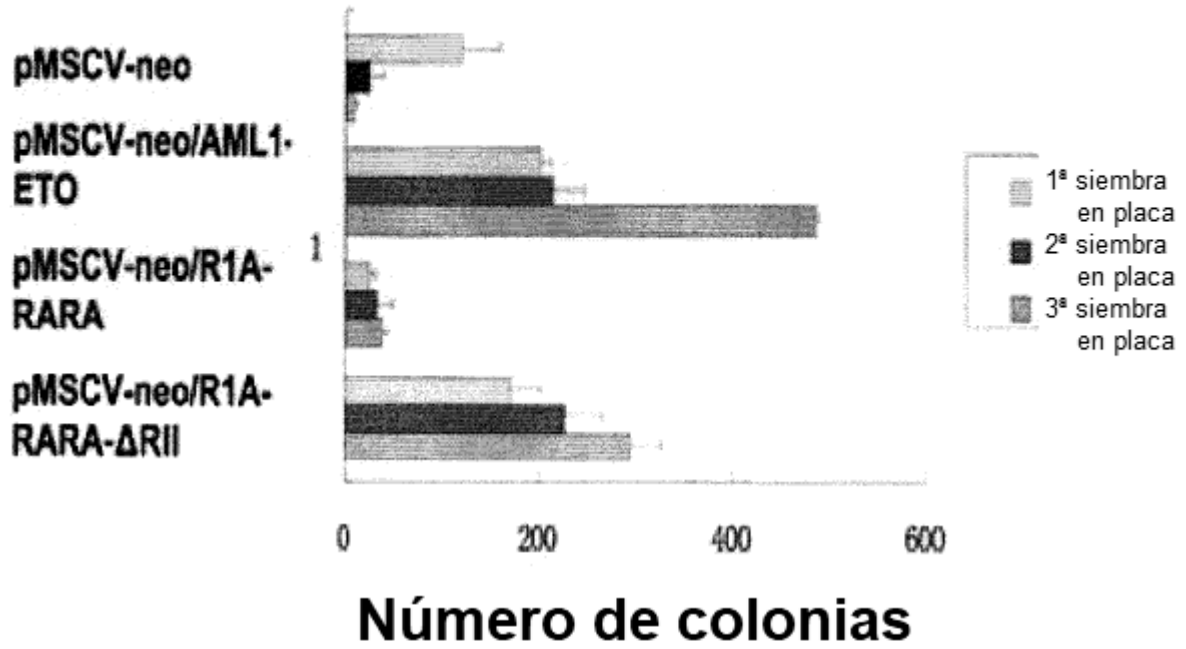


FIG. 23

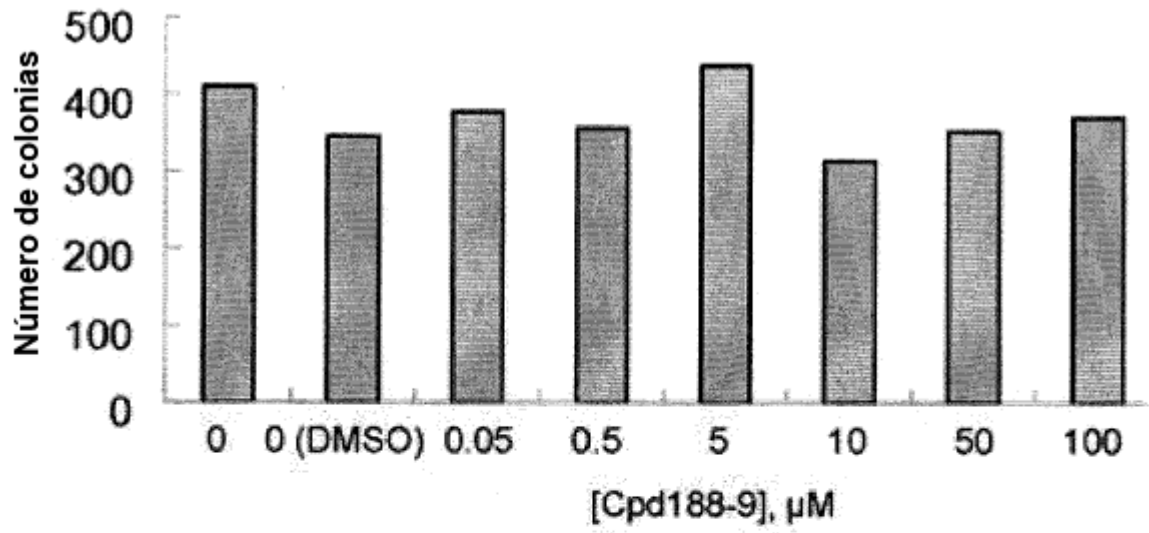


FIG. 24

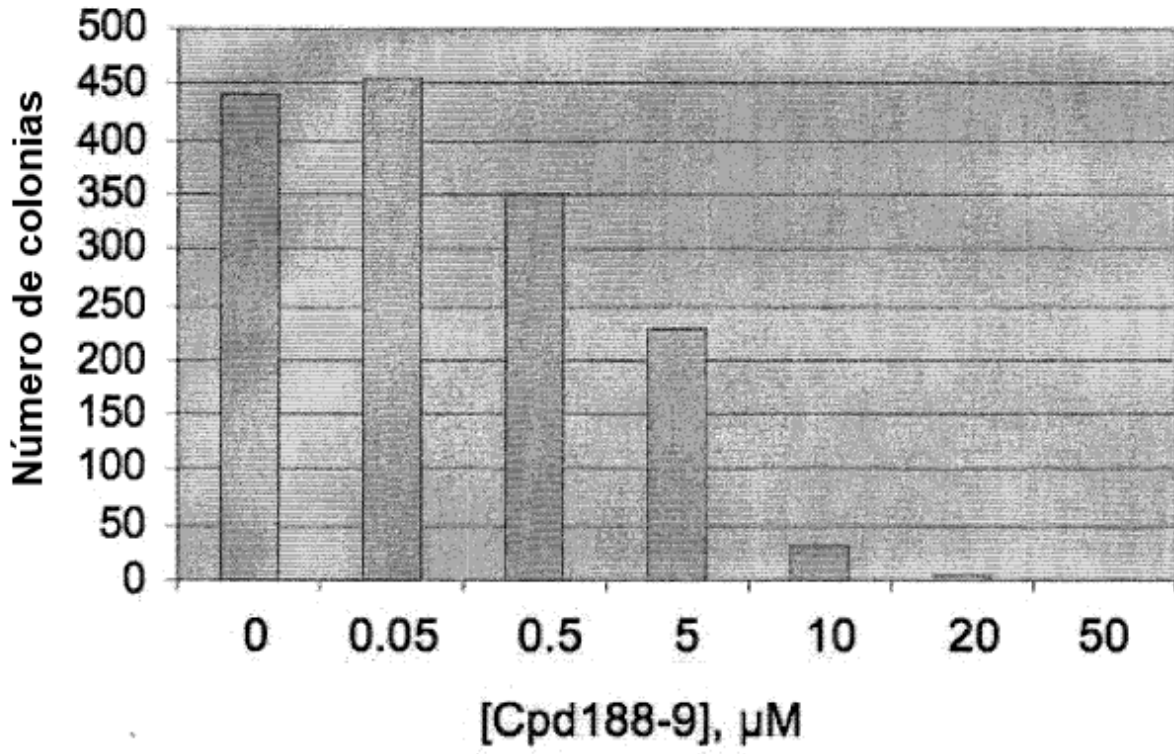


FIG. 25

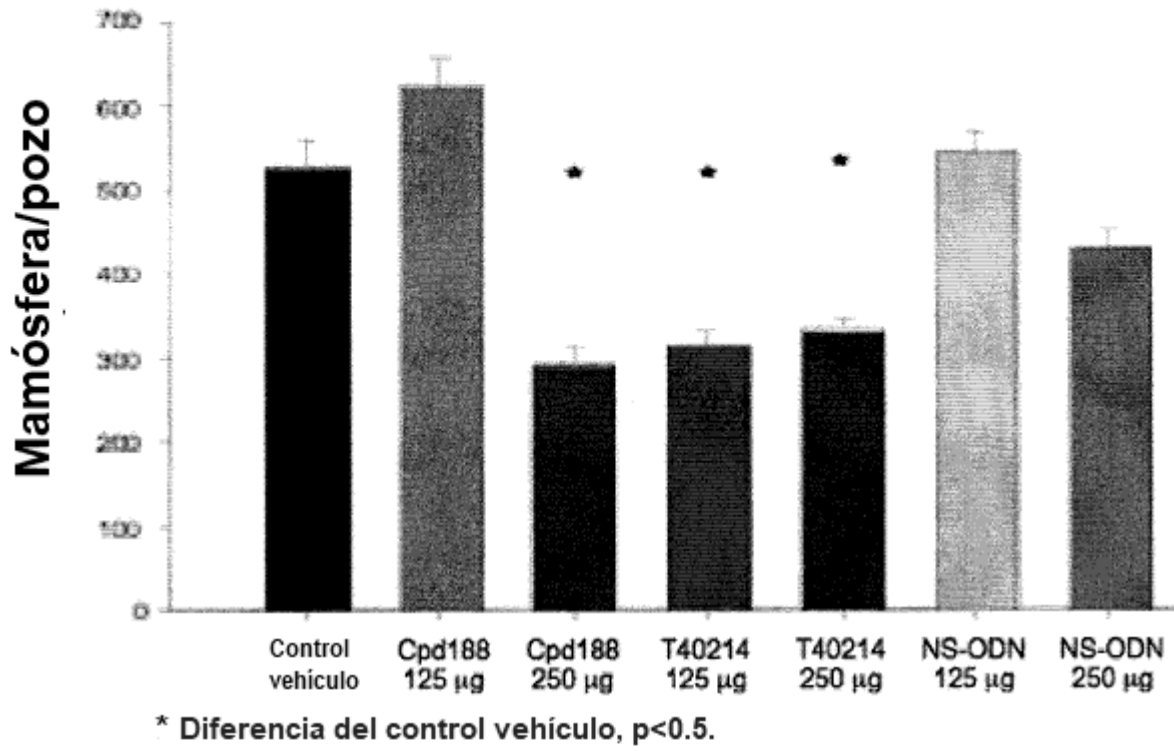


FIG. 26