

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 236**

51 Int. Cl.:

A61K 31/352 (2006.01)

C07D 311/78 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2010 PCT/US2010/033153**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010 WO10127235**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2010 E 10719562 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2432466**

54 Título: **Schweinfurthinas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

30.04.2009 US 174338 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2018

73 Titular/es:

**THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND
HUMAN SERVICES (50.0%)
Office of Technology Transfer National Institutes
of Health 6001 Executive Boulevard, Suite 325
Msc 7660
Bethesda, MD 20892-7660, US y
UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**REILLY, KARLYNE;
TURBYVILLE, THOMAS;
BEUTLER, JOHN, A. y
WIEMER, DAVID**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

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

ES 2 675 236 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

Schweinfurthinas y usos de las mismas

5 Referencia cruzada a una solicitud relacionada

Antecedentes de la invención

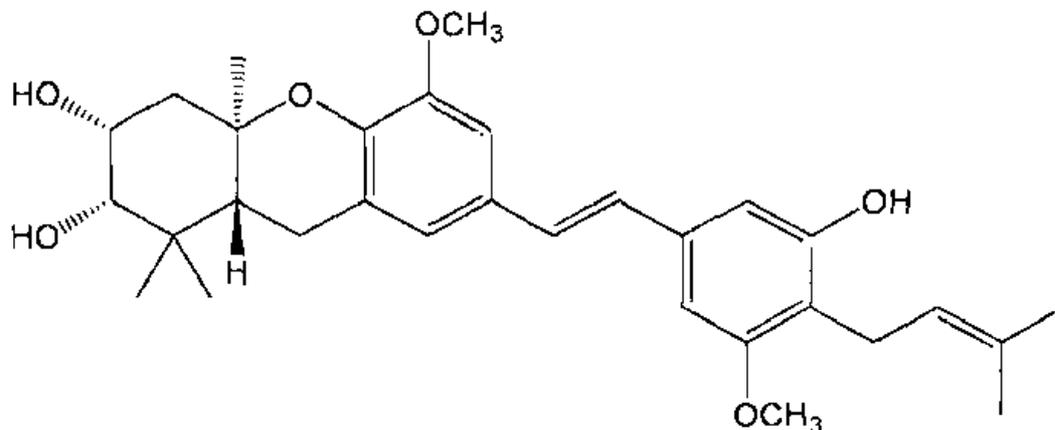
La neurofibromatosis tipo 1 (NF1) es una enfermedad genética común que afecta a 1 de cada 3500 personas, independientemente de su raza o etnia. NF1 se caracteriza por una variedad de lesiones benignas que afectan a muchos sistemas de órganos diferentes, así como un aumento del riesgo de varias neoplasias malignas. NF1 se define clínicamente por la presencia de neurofibromas (tumores benignos de nervios periféricos), manchas café con leche (manchas cutáneas pigmentadas), nódulos de Lisch (hamartomas del iris), gliomas de la vía óptica, desarrollo óseo anormal y consolidación ósea deficiente, problemas cardiovasculares tales como anomalías en la válvula cardíaca y los vasos sanguíneos, así como discapacidades cognitivas y dificultad de aprendizaje. Los pacientes con NF1 tienen un aumento del riesgo de desarrollar múltiples tipos de tumores, incluyendo tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos, astrocitomas/glioblastomas, feocromocitomas y leucemia. Muchas de las características benignas comunes de NF1, tales como manchas café con leche y neurofibromas, pueden ser extremadamente desfigurantes dando lugar a una calidad de vida en gran medida reducida. Los neurofibromas también pueden provocar dolor extremo que es muy difícil de aliviar. Los tumores malignos asociados con NF1 a menudo son incurables y la esperanza de vida para pacientes con NF1 se reduce significativamente en comparación con la población general. Muchas de estas manifestaciones de NF1 afectan a niños muy pequeños y requieren intervenciones quirúrgicas repetidas y dolorosas en el transcurso de su infancia y en la edad adulta. Debido a que NF1 es común, da como resultado un aumento de la mortalidad, da como resultado una disminución de la calidad de vida y no existen tratamientos disponibles en la actualidad, existe una necesidad no satisfecha para la identificación de una clase de fármacos específicos de NF1 para el tratamiento de NF1.

El documento WO 2005/092878 A2 se dirige a análogos de schweinfurthina. Beutler *et al.*, J. Nat. Prod., 61: 1509-1512 (1998), se dirigen a estilbenos de geranilo citotóxicos de *Macaranga schweinfurthii*. Neighbors *et al.*, Bioorg. Med. Chem., 14: 1771-1784 (2006), se dirigen a estudios de síntesis y actividad de estructura de análogos de schweinfurthina B. Yoder *et al.*, J. Nat. Prod., 70: 342-346 (2007), se dirigen a estilbenos y flavonoides prenilados antiproliferativos de *Macaranga alnifolia* de la selva tropical de Madagascar.

35 Breve resumen de la invención

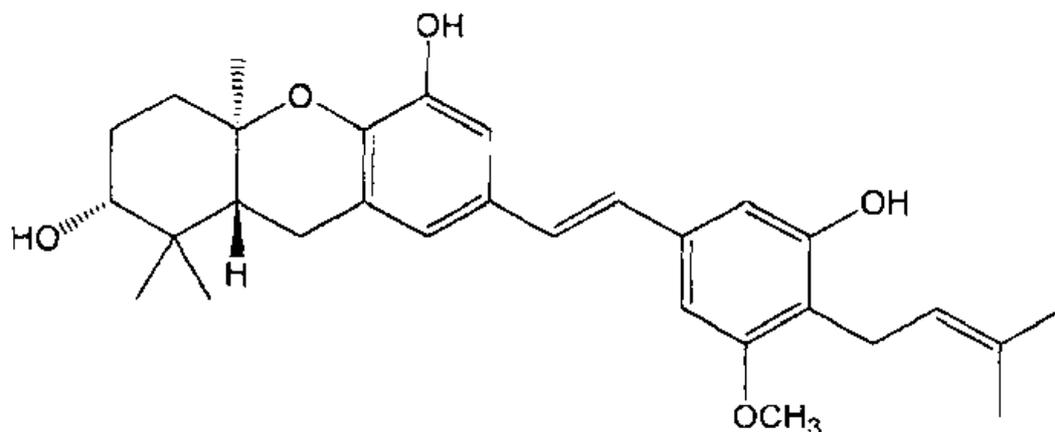
La invención proporciona en un modo de realización un compuesto o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el compuesto es una schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en el que la schweinfurthina es schweinfurthina B, 5'-metilschweinfurthina E o 5'-metilschweinfurthina G, para su uso en la prevención o tratamiento de una afección indeseable de neurofibromatosis tipo 1 en un sujeto portador de células homocigóticas nulas para el gen de neurofibromatosis tipo 1 (por ejemplo, *NF1*^{-/-}) o un sujeto que es haploinsuficiente para el gen de neurofibromatosis tipo 1 (por ejemplo, *NF1*^{+/-}).

45 En otro modo de realización, la invención proporciona un compuesto de la fórmula



50 o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro modo de realización, la invención proporciona un compuesto de la fórmula



o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un plano sintético global de schweinfurthinas de acuerdo con un modo de realización de la invención. Se muestra específicamente 3-desoxischweinfurthina B como ejemplo de referencia.

10

La figura 2A muestra un gráfico lineal del número medio de células tumorales (SF-295) del sistema nervioso central (SNC) humano de tres placas cada uno (las barras de error son desviaciones estándar de la muestra) evaluadas por el crecimiento de colonias teñidas con violeta cristal. Esta figura muestra que se inhibe el crecimiento clonal de células de glioma humano SF-295 por schweinfurthina A (SA).

15

La figura 2B muestra un gráfico lineal del número medio de clones A549 de tres placas cada uno (las barras de error son desviaciones estándar de la muestra) evaluadas por el crecimiento de colonias teñidas con violeta cristal. Esta figura muestra que no se inhibe el crecimiento de células de carcinoma de pulmón humano A549 después de la administración única de dosis variables de SA.

20

La figura 3 es un gráfico lineal que muestra la sensibilidad (porcentaje de viabilidad frente al control) de células SF-295, células tumorales de SNC de un ratón (KR158, que es *Nf1*^{-/-}; *Trp53*^{-/-}) y células A549 a concentraciones crecientes de SA. Esta figura muestra que SA inhibe selectivamente la clonogenicidad de las células de glioma.

25

La figura 4 es un gráfico lineal que muestra un ensayo de células vivas frente a muertas a concentraciones de SA variables. Los datos se trazan como un porcentaje de células tratadas solo con vehículo (control). Los puntos de datos son crecimiento porcentual medio de tres pocillos en comparación con los controles tratados con DMSO. Esta figura muestra que las células KR158 tratadas con SA muestran un aumento dependiente de la dosis de actividad de proteasa de células muertas.

30

La figura 5 es un gráfico lineal que muestra el porcentaje de viabilidad frente al control de células A549 en presencia de camptotecina (CPT) o SA a concentraciones crecientes. Esta figura también muestra que SA inhibe selectivamente la proliferación de células tumorales cerebrales SF-295 y KR158, ya que no inhibe las células tumorales de pulmón.

35

La figura 6 es un gráfico lineal que muestra la viabilidad de las células KR158 y cuatro cultivos de astrocitos primarios establecidos a partir de ratones wt, *Nf1*^{+/+} o *NPCis* en respuesta a SA medida por el ensayo XTT. Los puntos son crecimiento porcentual medio de tres pocillos. Esta figura también muestra que la SA inhibe selectivamente la proliferación de células tumorales cerebrales SF-295 y KR158, ya que no inhibe los astrocitos no tumorales.

40

La figura 7 es un gráfico lineal que muestra la proliferación de líneas celulares de astrocitos primarios evaluada por el ensayo XTT después de 96 horas de tratamiento continuo con las concentraciones indicadas de SA. Los puntos son crecimiento porcentual medio de 6 pocillos en comparación con los controles tratados con DMSO. La línea discontinua indica un 50 % de controles. Esta figura muestra que los astrocitos primarios de ratón son resistentes a SA.

45

La figura 8 es un gráfico de puntos que muestra el logaritmo del valor de GI_{50} trazado frente al tiempo de duplicación en horas de determinadas líneas celulares sometidas a prueba. Todas las líneas celulares NCI60 se trazan como círculos abiertos, trazándose las líneas de SNC como cuadros negros. Esta figura muestra que la respuesta de las líneas celulares NCI60 a SA no se correlaciona con la tasa de crecimiento de las líneas

50

celulares individuales.

5 La figura 9 es un gráfico lineal que muestra células KR158, células KR158 transducidas con vector vacío (PMSCV) y células KR158 transducidas de forma estable con el dominio NF1-GRD a concentraciones variables de SA, medidas por un ensayo XTT. Los puntos son crecimiento porcentual medio de tres pocillos en comparación con los controles tratados con DMSO. Esta figura muestra que la actividad de SA se deroga en células deficientes en *Nf1* por la expresión del dominio NF1-GRD.

10 La figura 10 es un gráfico lineal que muestra el porcentaje de viabilidad frente al control de KR158, K16561 de tumor maligno de la vaina de los nervios periféricos (MPNST) de ratón, K14553 de MPNST de ratón y células A549 humanas a concentraciones crecientes de SA. Esta figura muestra que las células KR158, las células K16561 y las células K14553 son sensibles a SA, mientras que las células A549 no lo son.

15 La figura 11 es un gráfico lineal que muestra el porcentaje de viabilidad frente al control de células MPNST T265 humanas a concentraciones crecientes de diversas schweinfurthinas. NSC#746620 es 5'-metilschweinfurthina G (5'MeSG), NSC#749946 es schweinfurthina B (SB) y NSC#749942 es 5'-metilschweinfurthina E (5'MeSE). De acuerdo con un modo de realización de la invención, esta figura muestra que las células T265 son sensibles a estos análogos sintéticos de SA.

20 La figura 12 es un gráfico lineal que muestra la línea celular MPNST humana T265 de un paciente con NF1 y células MPNST STS26T humanas esporádicas a concentraciones variables de SA medidas por el ensayo XTT. Esta figura muestra que las células T265 son sensibles a SA, mientras que las células STS26T no lo son.

25 La figura 13A es un gráfico lineal que muestra el porcentaje de viabilidad frente al control de células MPNST murinas (K14553) a concentraciones crecientes de diversas schweinfurthinas (abreviaturas como en la figura 11 y CPT es camptotecina). De acuerdo con un modo de realización de la invención, esta figura muestra que las células K14553 son sensibles a los análogos de SA SB, 5'MeSE y 5'MeSG.

30 La figura 13B es otro gráfico lineal que muestra el porcentaje de viabilidad frente al control de células K14553 a concentraciones crecientes de diversas schweinfurthinas (abreviaturas como en la figura 11 y NSC#735927 es 3-desoxischweinfurthina B (3dSB)). De acuerdo con un modo de realización de la invención, esta figura muestra que las células K14553 son sensibles a los análogos de SA SB, 5'MeSE y 5'MeSG.

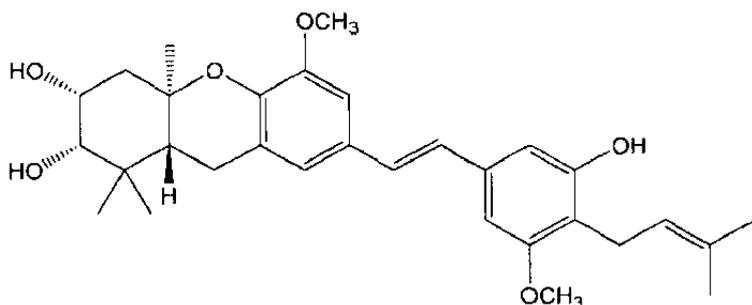
35 La figura 14 es un gráfico lineal que muestra el porcentaje de viabilidad frente al control de células MPNST murinas (K16561) a concentraciones crecientes de diversas schweinfurthinas (abreviaturas como las anteriores y 620 es 5'MeSG). De acuerdo con un modo de realización de la invención, esta figura muestra que las células K16561 son sensibles a los análogos de SA SB, 5'MeSE y 5'MeSG.

40 La figura 15 es un gráfico lineal que muestra el porcentaje de viabilidad frente al control de KR158, SF295 y células astrocíticas primarias a concentraciones crecientes de SA. Esta figura muestra que las células KR158 y SF295 son sensibles a SA, mientras que las células astrocíticas primarias no lo son.

Descripción detallada de la invención

45 La invención proporciona en un modo de realización un compuesto o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el compuesto es una schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en el que la schweinfurthina es schweinfurthina B, 5'-metilschweinfurthina E o 5'-metilschweinfurthina G, para su uso en la prevención o tratamiento de una afección indeseable de neurofibromatosis tipo 1 en un sujeto portador de células homocigóticas nulas para el gen de neurofibromatosis tipo 1 (por ejemplo, *NF1*^{-/-}) o un sujeto que es haploinsuficiente para el gen de neurofibromatosis tipo 1 (*NF1*^{-/+}).

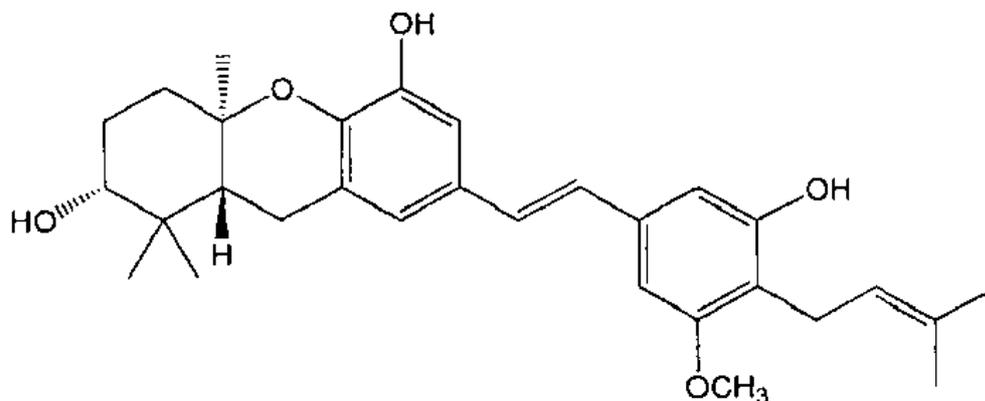
En otro modo de realización, la invención proporciona un compuesto de la fórmula



55

o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

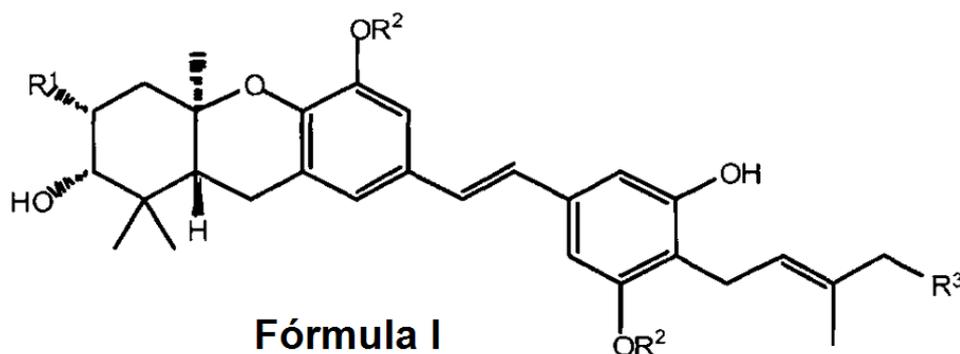
En otro modo de realización, la invención proporciona un compuesto de la fórmula



o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Las schweinfurthinas se aislaron originalmente a partir de un extracto de la planta camerunesa *Macaranga schweinfurthii* Pax. Schweinfurthina A ("SA") y B tienen una citotoxicidad diferencial significativa en el panel de línea celular NCI 60. Las líneas celulares del sistema nervioso central (SNC) y las líneas celulares de leucemia mostraron una sensibilidad particular a schweinfurthinas, con valores de CI_{50} en el intervalo nM bajo. SA también es una molécula pequeña altamente selectiva, que muestra una selectividad de 1000 veces. Las células más sensibles a SA son los gliomas. El proyecto de "El Atlas del Genoma del Cáncer" (TCGA) identificó a *NF1* como uno de los genes más frecuentemente mutados en los gliomas esporádicos. La patente de EE. UU. n.º 7.358.377 describe la síntesis de 3-desoxischweinfurthina B y compuestos relacionados.

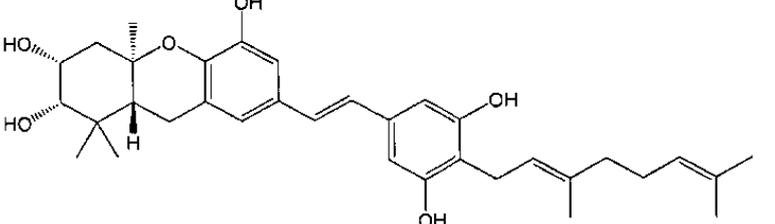
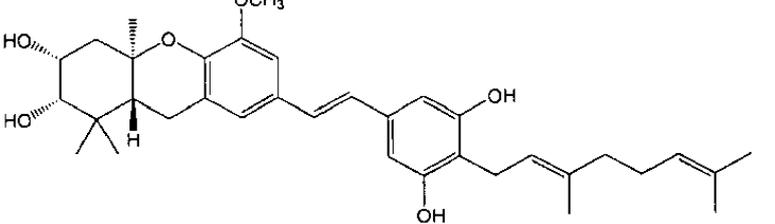
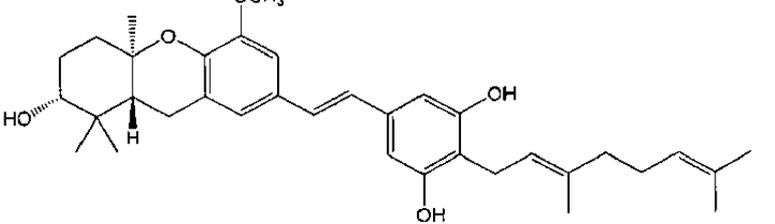
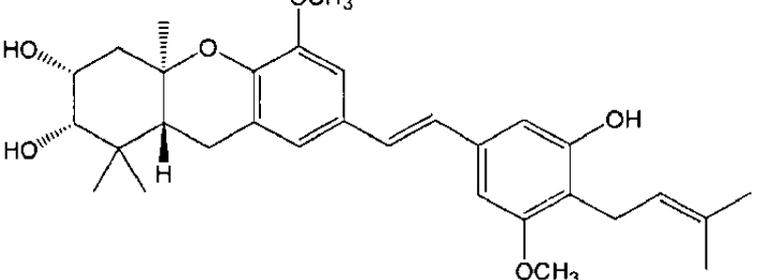
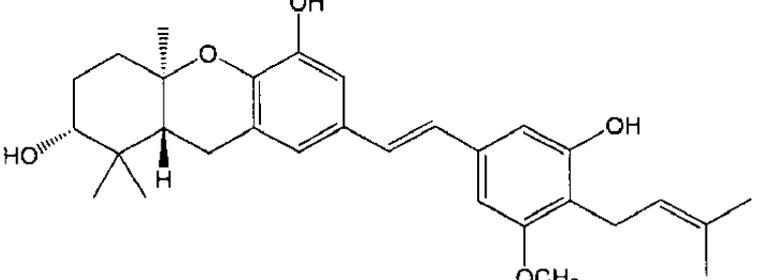
15 Las schweinfurthinas divulgadas en el presente documento incluyen compuestos de fórmula I, o una sal, profármaco, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, con la condición de que cuando R^1 y R^2 son H, R^3 no es un alqueno C_5 . La fórmula I está representada por:



25 en la que R^1 puede ser H o hidroxilo, cada R^2 puede ser independientemente H o alquilo, y R^3 puede ser H, alquilo o alqueno. En un modo de realización, R^1 puede ser H o hidroxilo, cada R^2 puede ser independientemente H o alquilo, y R^3 puede ser H, alquilo o alqueno, con la condición de que cuando R^1 y R^2 son H, R^3 no es un alqueno C_5 . Los radicales alquilo o alqueno pueden ser de cadena lineal o ramificados, teniendo el alquilo 1-12 átomos de carbono, preferentemente 1-6 átomos de carbono, y teniendo el alqueno 2-12 átomos de carbono, preferentemente 2-6 átomos de carbono. Específicamente, el alquilo puede ser, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, t-butilo, pentilo, 3-pentilo, etc.; el alqueno puede ser vinilo, alilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo, 5-hexenilo, etc. Además, los análogos de schweinfurthinas son compuestos de fórmula I en los que uno cualquiera de los átomos de oxígeno está reemplazado por un nitrógeno o azufre, por ejemplo, los isómeros de los compuestos de fórmula I y los derivados de schweinfurthinas son compuestos con una estructura de fórmula I con grupos químicos adicionales unidos a la fórmula I, siendo dichos grupos, por ejemplo, halo, hidroxilo, nitro, amino, haloalquilo, ciano, alquilamino, dialquilamino, formilo, alquilcarbonilo, alquilcarboxi, alquilcarboniloxi, y similares en el anillo o anillos aromáticos.

40 La tabla 1 muestra estructuras específicas de diversas schweinfurthinas descritas en el presente documento.

Tabla 1

Compuesto	Estructura
Schweinfurthina A (SA)	
Schweinfurthina B (SB)	
3-desoxischweinfurthina B (3dSB)	
5'-metilschweinfurthina E (5'MeSE)	
5'-metilschweinfurthina G (5'MeSG)	

Un profármaco de una schweinfurthina es un compuesto que libera la schweinfurthina en el organismo. Por ejemplo, cualquier grupo hidroxilo se puede convertir, por ejemplo, en un éster, amida, etc. Dichos profármacos se pueden convertir en el organismo, por ejemplo, en la sangre, o hidrolizar, por ejemplo, en las condiciones ácidas o alcalinas del aparato digestivo. Además, las schweinfurthinas se pueden unir covalentemente, por ejemplo, a polietilenglicol y/o sacáridos (tales como mono y/o polisacáridos) usando, por ejemplo, un grupo hidroxilo en la schweinfurthina. Para obtener información adicional sobre los profármacos, véase Higuchi y Stella, Prodrugs as Novell Delivery Systems, 14 de ACS Symposium Series, 14, 1975; Bundgaard, H., "Design of Bioreversible Drug Derivatives and the Utility of the Double Prodrug Concept" en Bioreversible Carriers in Drug Design; Roche, E. B., Ed.; Pergamon Press: Nueva York, 1987.

Un hidrato de una schweinfurthina es una schweinfurthina asociada con una molécula o moléculas de agua, tal

como 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 o más moléculas de agua por molécula de schweinfurthina. Dicha asociación se puede producir en estado sólido tras la cristalización de una schweinfurthina o tras la liofilización de una schweinfurthina.

5 Un solvato de una schweinfurthina es una schweinfurthina asociada con una molécula de disolvente. Por ejemplo, se puede disolver una schweinfurthina en un disolvente tal como metanol, etanol, acetona, acetonitrilo, etc. Tras el secado, la forma sólida del compuesto puede seguir estando asociada con las moléculas del disolvente.

10 Se cree que las schweinfurthinas son compuestos excelentes para el desarrollo de tratamientos para NF1 en general y para una variedad de afecciones asociadas a NF1. Estas afecciones incluyen manifestaciones debidas a la pérdida del gen *NF1* y la vía aberrante de *NF1*, en general. Los ejemplos específicos incluyen tumores, incluyendo tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos (MPNST), neurofibromas, astrocitomas pilocíticos, astrocitomas anaplásicos, glioblastomas (GBM), feocromocitomas, rabdomiosarcomas y leucemia mieloide, particularmente leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ). Schweinfurthina A muestra actividad a bajas concentraciones, con un valor GI₅₀ de 10 nM en células de astrocitoma mutantes de *Nf1*, sin inhibición de células heterocigóticas de *Nf1* a concentraciones de 1 μM, proporcionando un margen terapéutico potencial para el tratamiento de pacientes con NF1. Esto sugiere que las schweinfurthinas se podrían usar para tratar cualquier aspecto de la neurofibromatosis en el que la pérdida de heterocigosidad o la mutación anuladora del gen *NF1* desempeña un papel decisivo. Esto también podría incluir manifestaciones de enfermedades no tumorales, tales como pseudoartrosis, vasculopatía, dificultad de aprendizaje, entre otros.

25 "Homocigótico nulo" es la delección de ambos alelos de un gen o la pérdida de función de ambos alelos de un gen, que se puede deber a la eliminación completa de uno o ambos alelos, a la mutación de uno o ambos alelos, o a la eliminación de uno y a la mutación de otro. La "haploinsuficiencia" se produce cuando un alelo para un gen se deleciona o muta, y el alelo restante no produce suficiente producto génico para lograr la función en un nivel natural homocigótico.

30 Los términos "individuo" y "sujeto" se usan indistintamente. Preferentemente, el sujeto es un mamífero. El mamífero puede ser cualquier mamífero adecuado, tal como un mamífero seleccionado del grupo que consiste en un ratón, rata, cobaya, hámster, gato, perro, cerdo, vaca, caballo y primate. El mamífero preferentemente es un ser humano, en especial un paciente humano.

35 Una biopsia es la extracción de tejido y/o células de un individuo. Dicha extracción puede consistir en recoger tejido y/o células del individuo a fin de realizar experimentación en el tejido y/o las células extraídas. Esta experimentación puede incluir experimentos para determinar si el individuo tiene y/o está padeciendo de una determinada afección o cuadro clínico o para determinar el genotipo del individuo.

40 La modulación de una vía celular es una alteración, al aumentar o disminuir, la actividad de la vía. Dicha modulación de actividad, por ejemplo, se puede lograr a través de la alteración de la expresión de un producto génico (por ejemplo, proteínas, ARNm, etc.) dentro de la vía o la interacción directa con un producto génico de la vía.

45 Sin desear estar sujeto a ninguna teoría, la NF1 es provocada por mutaciones en el gen *NF1* que codifica la proteína neurofibromina. La neurofibromina tiene más de 2000 aminoácidos de largo atribuyéndose la única función bien caracterizada a un dominio de 300 aa en el medio de la proteína que funciona como una proteína activadora ras GTPasa (rasGAP), lo que da como resultado una regulación negativa de ras, que suprime funcionalmente la señalización de ras en las células. Cuando la neurofibromina está ausente o mutada, ras se hiperactiva y puede dar lugar a tumores. Se está acumulando evidencia de que los fenotipos asociados con la pérdida de *NF1* dependen de los reguladores del citoesqueleto Rho y Rac, proteínas que también forman parte de la superfamilia ras. Específicamente, se ha demostrado que la pérdida de *NF1* da como resultado una acumulación excesiva de fibras de estrés de actina que depende de la señalización de RhoA. Debido a que la neurofibromina tiene un papel importante en la regulación a la baja de ras, se ha descubierto que muchos tipos de células que son heterocigóticas (por ejemplo, *NF1*^{-/+}) son hipersensibles a los factores de crecimiento, lo que da como resultado un fenotipo haploinsuficiente. Por tanto, los pacientes con una mutación de la línea germinal en *NF1* pueden responder de manera diferente a los tratamientos dirigidos molecularmente en comparación con individuos normales, debido a la alteración de transducción de señales en las células de todo el cuerpo.

60 La schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma que se describe en el presente documento se puede administrar usando vehículos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes o diluyentes, son bien conocidos por los expertos en la técnica y están fácilmente disponibles para el público. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser cualquiera de los usados convencionalmente y está limitado solo por consideraciones quimicofísicas o biológicas, tales como solubilidad y ausencia de reactividad con la schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, ausencia de efectos secundarios nocivos o toxicidad bajo las condiciones de uso, y vía de administración. La elección del vehículo se determinará en parte por la forma particular de schweinfurthina

(por ejemplo, cualquier sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma). Un experto en la técnica apreciará que, además de las siguientes composiciones farmacéuticas descritas, los compuestos de la presente invención se pueden formular como complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina, o liposomas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua USP, solución salina, Cremophor EL (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), propilenglicol, polietilenglicol, alcohol y combinaciones de los mismos. Existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de la composición. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar como, por ejemplo, formulaciones orales, en aerosol, parenterales, subcutáneas, intravenosas, intraarteriales, intramusculares, interperitoneales, intratecales, rectales y vaginales. Están disponibles muchos procedimientos para preparar liposomas, como se describe en, por ejemplo, Szoka *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9, 467 (1980) y las patentes de EE. UU. 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

Los sistemas de administración útiles en el contexto de los modos de realización de la invención pueden incluir sistemas de administración de liberación prolongada, de liberación retardada y de liberación sostenida de manera que la administración de la composición de la invención se produce antes de, y con tiempo suficiente para provocar, sensibilización del sitio que se va a tratar. La composición de la invención se puede usar junto con otros agentes terapéuticos o tratamientos. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de la composición de la invención, aumentando de este modo la comodidad para el sujeto y el médico, y pueden ser particularmente adecuados para determinados modos de realización de composición de la invención.

Muchos tipos de sistemas de administración de liberación están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen sistemas basados en polímeros tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, poli(ácido hidroxibutírico) y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono, di y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; revestimientos de cera; comprimidos que usan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas erosivos en los que la composición activa está contenida en una forma dentro de una matriz tal como los descritos en las patentes de EE. UU. 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034 y 5.239.660 y (b) sistemas difusivos en los que un componente activo penetra a una tasa controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes de EE. UU. 3.832.253 y 3.854.480. Además, se pueden usar sistemas de administración de equipo basado en bombas, algunos de los cuales están adaptados para implantación.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden consistir en (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del compuesto disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina o zumo de naranja; (b) cápsulas, bolsitas, comprimidos, pastillas y tabletas, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y los alcoholes de polietileno, con o bien sin la adición de un tensioactivo, agente de suspensión o agente emulsionante farmacéuticamente aceptable. Las formas de cápsulas pueden ser del tipo de gelatina de cubierta dura o blanda corriente que contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio y almidón de maíz. Las formas de comprimidos pueden incluir una o más de lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, celulosa microcristalina, goma arábiga, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes disgregantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes y vehículos farmacológicamente compatibles. Las formas de pastillas pueden comprender el ingrediente activo en un aroma, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto, así como pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga, emulsiones, geles, y similares que contienen, además del ingrediente activo, vehículos tales como los que se conocen en la técnica.

Los vehículos adecuados y sus formulaciones se describen además en A.R. Gennaro, ed., Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19.^a ed.), Mack Publishing Company, Easton, PA (1995).

Las schweinfurthinas, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de las mismas de la presente invención, solas o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden preparar en formulaciones de aerosol para administrarse por inhalación. Estas formulaciones de aerosol se pueden colocar en propulsores presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. También se pueden formular como productos farmacéuticos para preparaciones sin presión, tales como en un nebulizador o un atomizador.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven la

formulación isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. La schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma se puede administrar en un diluyente fisiológicamente aceptable en un vehículo farmacéutico, tal como un líquido o mezcla de líquidos estéril, incluyendo agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de glúcidos relacionadas, un alcohol, tal como etanol, isopropanol o alcohol hexadecílico, glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, cetales de glicerol, tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, tales como poli(etilenglicol) 400, un aceite, un ácido graso, un éster de ácido graso o glicérido, o un glicérido de ácido graso acetilado con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión, tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

Los aceites, que se pueden usar en formulaciones parenterales, incluyen aceites de petróleo, animal, vegetal o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen cacahuete, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, vaselina y vaselina líquida. Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácido graso adecuados.

Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales grasas de metales alcalinos, amonio y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetilalquilamonio y haluros de alquilpiridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicérido, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácido graso, y copolímeros de polioxietileno-polipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, alquil-beta-aminopropionatos, y sales de amonio cuaternario de 2-alquilimidazolina, y (e) mezclas de los mismos.

Las formulaciones parenterales contendrán típicamente desde aproximadamente 0,5 a aproximadamente un 25 % en peso del ingrediente activo en solución. Se pueden usar conservantes y tampones adecuados en dichas formulaciones. A fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de inyección, dichas composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de desde aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en dichas formulaciones varía desde aproximadamente 5 a aproximadamente un 15 % en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácido graso de polietilen-sorbitano, tales como monooleato de sorbitano y los aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales se pueden presentar en envases sellados de dosis unitarias o multidosis, tales como ampollas y viales, y se pueden almacenar en estado criodesecado (liofilizado) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyectables, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente.

La schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, se puede preparar en formulaciones inyectables. Los requisitos para vehículos farmacéuticos eficaces para composiciones inyectables son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Co., Filadelfia, Pa., Banker y Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982), y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4.^a ed., páginas 622-630 (1986).

Adicionalmente, la schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma se puede preparar en supositorios mezclando con una variedad de bases, tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Las formulaciones adecuadas para administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o fórmulas de pulverización que contienen, además del ingrediente activo, vehículos tales como los que se conoce en la técnica que son apropiados.

La schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma o una composición de la misma también se puede administrar como una sal de adición de ácido, base neutralizada o de adición farmacéuticamente aceptable, formada por reacción con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico y ácido fumárico, o por reacción con una base inorgánica, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, y bases orgánicas, tales como mono, di, trialquil y arilaminas y etanolaminas sustituidas. La conversión en una sal se lleva a cabo por tratamiento del compuesto de base con al menos una cantidad estequiométrica de un ácido apropiado. Típicamente, la base libre se disuelve en un disolvente orgánico inerte tal como éter dietílico, acetato de etilo, cloroformo, etanol, metanol y similares, y se añade el ácido en un disolvente similar. La mezcla se mantiene a una temperatura adecuada (por ejemplo, entre 0 °C y 50 °C). La sal resultante precipita espontáneamente o se puede obtener de la solución con un disolvente menos polar.

Se pueden usar conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. Se puede usar opcionalmente una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o mezclas de los mismos están presentes típicamente en una cantidad de aproximadamente un 0,0001 % a aproximadamente un 2 % en peso de la composición total.

5 Los agentes tamponantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio y otros ácidos y sales diversos. Se puede usar opcionalmente una mezcla de dos o más agentes tamponantes. El agente tamponante o mezclas de los mismos están presentes típicamente en una cantidad de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 4 % en peso de la composición total.

10 Las formulaciones tópicas, incluyendo las que son útiles para la liberación transdérmica de fármacos, son bien conocidas por los expertos en la técnica y son adecuadas en el contexto de los modos de realización de la invención para la aplicación en la piel.

15 La concentración de schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma de la invención en las formulaciones farmacéuticas puede variar, por ejemplo, desde menos de aproximadamente un 1 %, normalmente a o al menos aproximadamente un 10 %, hasta tanto como un 20 % a un 50 % o más en peso, y se puede seleccionar principalmente por volúmenes de líquido y viscosidades, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

20 Los términos "tratar" y "prevenir", así como las palabras derivadas de los mismos, como se usan en el presente documento, no implican necesariamente un tratamiento o prevención completo o al 100 %. Por ejemplo, puede incluir 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 %. Por el contrario, existen diversos grados de tratamiento o prevención de los cuales los expertos en la técnica reconocen que tienen un beneficio o efecto terapéutico potencial. A este
25 respecto, los procedimientos de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención de una afección asociada, por ejemplo, con tumores asociados con NF1 o el sistema nervioso periférico. Además, el tratamiento o prevención proporcionado por el procedimiento de la invención puede incluir el tratamiento o la prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad que se está tratando o previniendo. Además, para los fines del presente documento, "prevención" puede abarcar aumentar la
30 longevidad o retrasar el inicio de la enfermedad, o un síntoma o afección de la misma, e incluye, por ejemplo, la prevención de la conversión de tejidos premalignos a tejidos malignos así como la prevención de metástasis.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una dosis que es adecuada para prevenir o tratar una enfermedad o afección, por ejemplo, tumores asociados con NF1 o el sistema nervioso periférico o manifestaciones no tumorales tales como pseudoartrosis. Las cantidades eficaces para un uso terapéutico o profiláctico dependerán, por ejemplo, del estadio y la gravedad de la afección, enfermedad o trastorno que se está tratando, la edad, el peso y el estado general de salud del paciente, y el criterio del médico prescriptor. El tamaño de la dosis también estará determinado por la schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma seleccionado, el procedimiento de administración, el horario y la frecuencia de administración, así como la
40 existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de una schweinfurthina particular, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma y el efecto fisiológico deseado. Un experto en la técnica apreciará que diversas afecciones, enfermedades o trastornos podrían requerir un tratamiento prolongado que implique administraciones múltiples, tal vez el uso de una schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma en cada una o
45 diversas tandas de administración. Las dosis típicas pueden ser, por ejemplo, de 0,1 mg a 1 g al día, tal como de 5 mg a 500 mg al día. Los ejemplos no limitantes de dosis pueden ser, por ejemplo, más altas para tratar una afección, enfermedad o trastorno existente y más bajas para prevenir una afección, enfermedad o trastorno. Por ejemplo, para tratar una afección, enfermedad o trastorno existente, la dosis puede ser de 1 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 400 mg, 500 mg o más alta cada día. Por ejemplo, para prevenir una afección,
50 enfermedad o trastorno, la dosis puede ser de 0,01 mg, 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg o más alta cada día.

Los procedimientos para preparar composiciones administrables (por ejemplo, administrables por vía parenteral) son conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen con más detalle, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science (17.^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985).

55 Cuando una schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma se administra con uno o más agentes terapéuticos adicionales, se pueden coadministrar uno o más agentes terapéuticos adicionales al individuo. Por "coadministración" se quiere decir administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales y una schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de las
60 misma suficientemente cercanos en el tiempo de manera que una schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma pueda potenciar el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales. A este respecto, se puede administrar en primer lugar una schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y el uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar en segundo lugar, o viceversa. De forma alternativa, una schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato
65 farmacéuticamente aceptable de la misma y el uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar simultáneamente. Otros compuestos que se pueden coadministrar con una schweinfurthina, o una

sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, pueden incluir compuestos que son antineoplásicos y/o inhiben el crecimiento tumoral, tales como camptotecina o doxorubicina. Además, se pueden coadministrar otros compuestos que inhiben la vía ras.

- 5 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero, por supuesto, no se deben interpretar de ninguna manera como limitantes de su alcance.

EJEMPLO 1

- 10 Este ejemplo demuestra un procedimiento sintético para schweinfurthinas combinando diferentes mitades derecha e izquierda del compuesto.

Se ha llevado a cabo la síntesis de schweinfurthinas B, C, E, F y G naturales, así como muchos derivados sintéticos. Se han sometido a prueba un total de 47 análogos sintéticos de las schweinfurthinas naturales en un ensayo de línea celular NCI 60, mostrando 34 cierta selectividad. Además, se han sintetizado los enantiómeros (*R,R,R*) y (*S,S,S*) de la schweinfurthina F, lo que dio lugar a la identificación del enantiómero (*R,R,R*) como forma natural. La estrategia sintética se basa en la construcción de schweinfurthinas como una mitad de fosfonato y una mitad de aldehído (figura 1), que luego se combinan para ensamblar la olefina de estilbeno por medio de una condensación Horner-Wadsworth-Emmons (Mente *et al.*, J. Org. Chem., 2008, 73:796370; Neighbors *et al.*, J. Org. Chem., 2005, 70:925-31).

Este enfoque permite el desarrollo de muchos análogos a través de un enfoque de mezcla y emparejamiento de combinar diferentes mitades derecha e izquierda. La síntesis del análogo de schweinfurthina B, 3-desoxischweinfurthina B (figura 1), se ha optimizado para requerir solo 10 etapas, avanza con aproximadamente un 32 % de rendimiento global, preparándose más de 400 mg. Para mejorar la estabilidad de las schweinfurthinas sintéticas, el anillo D se ha modificado para que lleve un grupo hidroxilo y uno metoxi (por ejemplo, 5'-metilschweinfurthina E y 5'-metilschweinfurthina G). Estos compuestos son comparativamente activos con valores GI₅₀ en el intervalo nM bajo, pero parecen ser más estables químicamente que los resorcinolos libres.

30

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

Este ejemplo demuestra el efecto de las schweinfurthinas en células *NF1*^{-/-} y demuestra que las schweinfurthinas pueden actuar a través de un mecanismo celular novedoso.

35

Líneas celulares y cultivo: Las líneas tumorales humanas SF-295 y A549 se obtuvieron a partir del Developmental Therapeutics Program (NCI, Frederick, MD, EE. UU.) a partir de estirpes usadas en el ensayo de células NCI 60. Las líneas tumorales de ratón se generaron a partir de tumores de ratón *NPcis* (véase a continuación). El aislamiento del astrocitoma KR158 se describió previamente (Reilly *et al.*, Nat. Genet., 2000, 26:109-13). Las líneas tumorales K16561 y K14553 se aislaron a partir de sarcomas en ratones *NPcis*, y se caracterizaron como MPNST por inmunocitoquímica (véase a continuación) para marcadores de células de Schwann (S100 y p75), que se encontró que eran positivos, y marcadores musculares (MyoD1 y Myf4) (Reilly *et al.*, Cancer Res., 2006, 66:62-8), que se encontró que eran negativos, así como para la pérdida de la copia wt de *Nf1* y *Trp53* por PCR como se describe previamente (Reilly *et al.*, Nat. Genet., 2000, 26:109-13). Se cultivaron las células humanas en RPMI 1640 y se cultivaron las células de ratón en DMEM que contenía un 10 % de suero bovino fetal suplementado con 2 mmol/l de glutamina y se incubaron en una atmósfera humidificada a 37 °C (5 % de CO₂).

45

Secuenciación de *NF1* y detección de proteínas de neurofibromina en células SF-295: Se aisló el ARN total de SF-295 a partir de una placa de 10 cm de células confluentes usando reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN total aislado se cuantificó usando un NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.). Antes de la síntesis de ADNc, se trató por desoxirribonucleasa el ARN total con DNasefree (Ambion, Austin, TX, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. Se sintetizó el ADNc a partir de 5 µg de ARN total usando el sistema de síntesis de la primera hebra SuperScript para RT-PCR (Invitrogen). Se aisló el ADN genómico SF-295 a partir de una placa de 10 cm de células confluentes por digestión durante la noche en Tris 100 mM, pH 8,5, EDTA 5 mM, SDS al 0,2 %, NaCl 200 mM, proteinasa K 400 µg/ml. Después de la digestión, se precipitó el ADN genómico, se resuspendió en dH₂O y se trató con dos tandas de purificación con fenol/cloroformo. Se diseñaron conjuntos de cebadores superpuestos (SEQ ID NOS: 1-16 como cebadores directos con SEQ ID NOS: 17-32 como cebadores inversos, respectivamente) para abarcar la región de codificación del ARNm de neurofibromina 1 humana (*NF1*) (accesión NM_001042492). Además se diseñó un conjunto de cebadores adicional (SEQ ID NO: 33 como cebador directo con SEQ ID NO: 34 como cebador inverso) para amplificar la 5' UTR y el exón 1 del ADN genómico de neurofibromina 1 (*NF1*) de *Homo sapiens* (accesión NG_009018). Para cada uno de los cebadores directos e inversos, se añadió una secuencia líder M13 al extremo 5' para facilitar la secuenciación de los productos de PCR (SEQ ID NOS: 35-50 como cebadores directos con SEQ ID NOS: 51-66 como cebadores inversos, respectivamente, SEQ ID NOS: 35-66 que muestran las secuencias de cebadores completas con M13; SEQ ID

65

NO: 67 da el cebador directo con la secuencia M13 de la 5' UTR y el exón 1, SEQ ID NO: 68 da el cebador inverso con la secuencia M13 de la 5' UTR y el exón 1). Se sintetizaron los productos de PCR usando Taq ADN polimerasa Platinum de alta fidelidad (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Los productos de PCR se purificaron en gel usando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.). Se ensamblaron y alinearon las secuencias usando Lasergene SeqMan Pro (DNASTAR, Madison, WI, EE. UU.).

Inmunoelctrotransferencia para la expresión de neurofibromina: Se recogieron lisados de células completas clarificados por centrifugación, completamente procesados en hielo, de líneas celulares KR158, SF-295 y A549 usando tampón de lisis (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, NaF 25 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10 %, Triton X-100 al 1 %, pH 7,5, al que se añadió recientemente PMSF 1 mM, 10 µg/ml de aprotinina, 5 µg/ml de leupeptina y ortovanadato de Na 1 mM). Después de la separación con gel de acrilamida, se transfirieron las bandas a una membrana de PVDF usando el protocolo estándar pero omitiendo el tampón de metanol para aumentar la transferencia de bandas de alto peso molecular (90 min, 75 V). Se sondearon transferencias con anticuerpo policlonal de conejo a NF1, N-terminal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU., Sc-68, diluido 1:1000), usando HRP anti-conejo de cabra secundario (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, EE. UU., 1:25.000) y anti-GAPDH (Advanced Immunochemicals, Inc., Long Beach, CA, EE. UU., 1:1000), usando HRP anti-ratón de cabra secundario (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 1:25.000). Las reacciones se visualizaron usando ECL Plus (Amersham/GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) y se detectaron con Syn Gene Bio Imager. La NF1 principal tenía un tamaño de ~250 kD.

Establecimiento de líneas celulares MPNST *NPCis*: Los ratones se sacrificaron por asfixia con CO₂ y se diseccionaron los tumores. Se midió el volumen del tumor. Luego, se cortó el tumor a la mitad y se fijó ½ en PFA al 4 %. Se enjuagó la otra mitad, luego se cortó en 24 trozos de aproximadamente el mismo tamaño. Se cortó cada trozo en dados con una cuchilla de afeitar y se colocó en 1 pocillo de una placa de 24 pocillos, junto con 625 µl de Triple Express (Gibco, Grand Island, NY, EE. UU.) y 5 µl de desoxirribonucleasa recombinante (Roche, Indianapolis, IN, EE. UU.). Se trituraron los tumores, luego se incubaron a 37 °C en una estufa de incubación con CO₂ al 5 % durante 2-5 horas, con una trituración adicional a la mitad del tiempo de incubación. Al final de la incubación, se trituraron de nuevo los trozos tumorales, y se transfirieron las células suspendidas a tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se añadió un ml de DMEM a cada tubo, y se centrifugaron los tubos a 4000 rpm durante 10 min. Se retiró el medio del sedimento y se desechó. Se resuspendió el sedimento celular en 1 ml de DMEM y se plaquéó en una nueva placa de 24 pocillos. Después de 24-72 horas de incubación, se transfirieron los medios que contenían células no adherentes a una segunda placa de 24 pocillos, y se alimentaron las células adherentes con DMEM nuevo. Se controlaron ambas placas para determinar el crecimiento celular, se cultivaron hasta placas de 10 cm y se congelaron en DMSO al 10 %. Se recogieron lisados de ADN, ARN y proteína para una caracterización adicional.

Caracterización de MPNST por PCR e inmunocitoquímica: Se usaron dos líneas celulares, JW3 y JW6, en estos experimentos. JW3 se derivó a partir de un sarcoma en el ratón K14553, y JW6 a partir de un sarcoma en el ratón K16561. Se genotipó el ADN para *Nf1* y *p53* como se describe previamente (Reilly *et al.*, Nat. Genet., 2000, 26:109-13) para confirmar la pérdida de heterocigosidad. Se realizó la inmunocitoquímica para determinar la expresión de MPNST y de los marcadores de rdbomiosarcoma. Se plaquearon las células en cubreobjetos de 22 mm en placas de 6 pocillos. Se cultivaron las células hasta una confluencia del 50-70 %, luego se fijaron en PFA al 4 %, se lavaron 3X en PBS y se almacenaron en PBS. Se permeabilizaron las células en Triton-X al 0,2 % durante 15 min, luego se enjuagaron 3X en PBS. Se bloquearon las células durante 1 hora en suero caprino normal al 5 % (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU.) con Tween-20 al 0,01 %. Las células se tiñeron durante la noche a 4 ° en 1:100 de AB1554 de receptor NGF, p75 anti-ratón de conejo (Chemicon, Temecula, CA, EE. UU.), 1:1000 de S100 anti-vaca de conejo (Dako, Carpinteria, CA, EE. UU.), 1:50 de clon 5.8A anti-MyoD1 de ratón (Dako), y 1:30 de anti-Myf4 AB 1554 de ratón (Novocastra, Newcastle upon Tyne, Reino Unido). Se incubaron las células con 1:400 de anti-IgG de conejo caprino Alexa Fluor 488 de Invitrogen, o anti-ratón caprino Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), respectivamente, junto con 1:5000-1:8000 de DAPI y 1:2000 de faloidina Texas Red (ambos de Molecular Probes/Invitrogen). Se montaron las células en portaobjetos Vectashield y se examinaron con una Nikon Eclipse E6000, y se fotografiaron a 40X aumentos usando SPOT 3.5.9 para MacOSX. Los tiempos para cada longitud de onda se mantuvieron consistentes para cada anticuerpo que se sometía a prueba. Para la tinción de S100, el tiempo de exposición de S100 fue de 250 ms, de faloidina fue de 1000 ms y de DAPI de 50 ms. Para la tinción de p75, los tiempos de exposición fueron de 250 ms para p75, de 500 ms para faloidina y de 15 ms para DAPI. Para la tinción de MyoD1 y Myf4, los tiempos fueron de 2000 ms para MyoD1 y Myf4, y de 500 ms para faloidina. Se usó la línea celular RD, derivada de un rdbomiosarcoma humano (obtenido de NIH, Bethesda, MD, EE. UU.) como control positivo para MyoD1 y Myf4. Se usaron MEF como control negativo para la expresión de S100.

Se realizaron todos los procedimientos con ratones de acuerdo con las directrices del NCI-Frederick Animal Care and Use Committee.

Ensayos clonogénicos: Se trataron monocapas de células durante 18 horas con SA, y luego se recogieron, se contaron y se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de 1000 células por placa. Después de una semana, se tiñeron las colonias macroscópicas con violeta cristal (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) y se contaron.

Ensayo de proliferación de células XTT: Se sembraron las células en placas de 96 pocillos a una densidad de 2.000 células/pocillo y se dejaron volver a unir durante la noche. Se trataron las células con SA, análogos sintéticos, camptotecina (NCI Chemotherapeutics Repository, MD, EE. UU.) o control con DMSO en las concentraciones indicadas de forma continua durante 48 horas, seguido del ensayo en la placa de 96 pocillos para determinar el número relativo de células viables usando el colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (XTT) y un lector de placas Wallac-Victor 2 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EE. UU.). Se determinó la absorbancia a 450 nm con 650 nm como lectura de referencia. Se analizaron adicionalmente los astrocitos primarios en un punto temporal de 96 horas.

Ensayo de citotoxicidad: Se usó el ensayo de citotoxicidad múltiple MultiTox-Fluor (Promega, Madison, WI, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recogieron células KR158 y se sembraron 2.500 células/pocillo en una placa de 96 pocillos con paredes negras (Corning, Lowell, MA, EE. UU.). Se trataron las células con SA o control con DMSO a las concentraciones indicadas de forma continua durante 48 horas seguido de la adición de los sustratos fluorescentes del kit de ensayo. El sustrato GF-AFC se incorpora en las células vivas donde se escinde por la proteasa de células vivas para liberar AFC. El sustrato bis-AAF-R110 no se puede incorporar en las células vivas, sino que en su lugar se escinde por la actividad proteasa de las células muertas para liberar R110.

Schweinfurthina A muestra actividad diferencial hacia el glioma humano SF-295 y las células de astrocitoma KR158 pero no sobre los astrocitos primarios derivados de ratones wt, *Nf1*^{-/+} y *NPcís*. Para confirmar la selectividad de SA observada en el ensayo de NCI 60, se usó un estudio de clonogenicidad celular en el que se trataron monocapas confluentes de células GBM SF-295 durante 18 horas con SA. Se usaron células de cáncer de pulmón A549 como control para comparación, debido a que demuestran resistencia relativa a SA en comparación con las líneas de tumores cerebrales en el ensayo de células cancerosas NCI-60. Luego se rescataron las células tratadas con SA del fármaco, se recogieron y se sembraron a bajas densidades. Como se observa en la figura 2, el crecimiento de colonias se restringió drásticamente en las células sensibles, mientras que las células A549 formaron colonias hasta la concentración más alta de SA sometida a prueba. La actividad de SA se caracterizó adicionalmente en una línea celular de astrocitoma grado III invasor (KR158) derivada de ratón *NPcís*. La línea GBM humana SF-295 y la línea de astrocitoma de ratón KR158 se compararon con la línea celular de cáncer de pulmón A549 resistente a SA en ensayos de proliferación de dos días. SA inhibió ambas líneas celulares KR158 y SF-295 de una manera dependiente de la dosis, sin efecto aparente en la línea celular A549 (figura 3). El ensayo XTT usado en estos experimentos mide la actividad metabólica de las enzimas asociadas mitocondriales que se inactivan después de la muerte celular, y es un criterio de valoración validado para medir la inhibición de la proliferación. Sin embargo, debido a que no mide directamente la citotoxicidad, se empleó un ensayo de proteasa celular que mide la viabilidad celular y la citotoxicidad detectando simultáneamente dos actividades de proteasa distintas. En este ensayo, se observó un aumento dependiente de la dosis en la destrucción celular en células KR158 después de 48 horas de tratamiento continuo con SA (figura 4), lo que indica que SA actúa por un mecanismo citotóxico en lugar de citostático.

Para demostrar que las células A549 en general no son resistentes a la inhibición del crecimiento de moléculas pequeñas, se sometió a prueba la camptotecina (CPT), un inhibidor de la topoisomerasa 1 que induce la apoptosis en células en proliferación, como control positivo. A549 era sensible a CPT, lo que indica que el metabolismo general del fármaco regulado al alza, o un aumento de la salida del fármaco inespecífica, no eran responsables de potenciar la supervivencia de las células tumorales insensibles a SA en presencia del fármaco (figura 5). Además, los astrocitos no transformados tienen la capacidad de proliferar; por lo tanto, se sometió a prueba SA frente a los astrocitos primarios de recién nacidos wt, *Nf1*^{-/+} y *NPcís*. Se encontró que estas células eran resistentes a los efectos de SA sobre la proliferación (figura 6), incluso después de 96 horas de tratamiento (figura 7). Incluso a concentraciones de SA logarítmicas varias veces más altas que el valor de GI₅₀ para KR158, los astrocitos primarios no se inhibieron más de aproximadamente un 40 % en su crecimiento, dependiendo de la línea de astrocitos individual sometida a prueba. Debido a que los astrocitos primarios crecen más lentamente que las células tumorales, es posible que los efectos de SA estén limitados a células que proliferan más rápidamente. Para abordar este problema, se examinó la respuesta de las líneas celulares NCI60 a SA. Los tiempos de duplicación de las células NCI60 están bien caracterizados. La sensibilidad a SA no se correlaciona con el tiempo de duplicación de la línea tumoral (figura 8). De hecho, una de las líneas SNC de crecimiento más lento, SNB-75 con un tiempo de duplicación de 62,8 horas, es una de las líneas más sensibles a SA (logGI₅₀ = -7,82), mientras que una de las líneas SNC de crecimiento más rápido, SF-268 con un tiempo de duplicación de 33,1 horas, es la línea SNC más resistente a SA (logGI₅₀ = -5,62). Estos datos sugieren que la actividad de SA se dirige al fenotipo transformado de las células de astrocitoma, y no a una característica general de la división celular que se puede encontrar en las células cerebrales en proliferación.

Usando el programa COMPARE (Keskin *et al.*, *Anticancer Drug Des.*, 2000, 15:79-98) se encontró que las schweinfurthinas parecen tener un modo novedoso de acción y pueden representar un nuevo farmacóforo.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

Este ejemplo demuestra cambios en el citoesqueleto en presencia de schweinfurthinas.

Se usaron los procedimientos de cultivo celular del ejemplo de referencia 2 además de los procedimientos detallados a continuación.

5

Cultivo celular: Se prepararon los astrocitos primarios como se describe previamente (Hawes *et al.*, J. Biomol. Screen, 2008, 13:795-803) a partir de cerebros de recién nacidos de 1 día de edad recogidos de ratones wt, *Nf1*^{-/-} y *Nf1*^{+/-}; *Trp53*^{-/-} cis.

10

Construcciones y transfecciones: Se obtuvieron las construcciones retrovirales NF1-GRD de la Universidad de Indiana. Se mantuvieron las células transducidas con la construcción NF1-GRD o control de vector vacío PMSCV como se describe previamente (Hiatt *et al.*, J. Biol. Chem., 2001, 276:7240-5) en 1 µg/ml de puomicina (Sigma).

15

Generación de células KR158 que expresan EGFP-actina estable para obtención de imágenes de células vivas: Debido a que la línea celular KR158 porta un marcador de resistencia a neomicina, se insertó un casete de resistencia a zeocina en pEGFP-actina (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU., n.º cat. 6116-1) a fin de producir una línea celular KR158/pEGFP-actina transfectada de forma estable. Se amplificó el casete de zeocina por PCR a partir del plásmido AP-5Tag (obtenido de NCI, Frederick, MD, EE. UU.) usando cebadores que contienen sitios de restricción Stu I (sentido: 5'-gcg cgc agg cct tgt tga caa tta atc atc ggc-3' (SEQ ID NO: 1) y antisentido: 5'-gcg cgc agg cct tca gtc ctg ctc ctc ggc cac-3' (SEQ ID NO: 2)). Se digirió con restricción el producto de PCR y se ligó en pEGFP-actina. Se cribaron los clones positivos por digestión de restricción para determinar la presencia del casete insertado. Las células KR158 transfectadas de forma estable con GFP-actina se suplementaron con 10 µg/ml de zeocina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.).

20

25

Estudios de doxorrubicina: Se trataron KR158 transfectadas de forma estable con GFP-actina con 25 y 50 µM de doxorrubicina durante 18 horas de forma continua.

30

Ensayos de morfología celular y microscopía confocal: Para analizar la morfología del citoesqueleto, se sembraron células KR158, astrocitos primarios de ratón, clones KR158 que expresan las construcciones NF1-GRD, células K14553 y A549 en cubreobjetos y se dejaron volver a unir durante la noche. Se trataron las células durante 18 horas con las concentraciones indicadas de SA, o bien con el control con DMSO de vehículo. Se fijaron los cubreobjetos en paraformaldehído al 3,7 %, se permeabilizaron en Triton-X100 al 0,1 % y se tiñeron con Alexa Fluor 488-faloidina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) para detectar actina y se montaron las células en Prolong Antifade que contenía DAPI (Invitrogen) para teñir los núcleos. Se obtuvieron imágenes de las células en un microscopio confocal LSM510 (Carl Zeiss Inc., Jena, Alemania). Para la detección de la cadena ligera de fosfo-miosina 2 (MLC), se sembraron las células en cubreobjetos como se describe anteriormente. Las células se privaron de suero en FBS al 0,5 % y SA o control de vehículo con DMSO durante 18 horas, y luego se pulsaron con 10 ng/ml de EGF (Invitrogen) durante 5 min. Se fijaron los cubreobjetos y se permeabilizaron como se describe anteriormente y se inmunotñeron con un anticuerpo primario de MLC fosfoespecífico Ser19 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU., n.º cat. 3671S) y uno secundario anti-conejo caprino Alexa Fluor 555 (Invitrogen), y se contratiñeron con Alexa Fluor 488-faloidina (Invitrogen) para detectar actina. Se montaron las células en reactivo Prolong Gold Antifade que contenía DAPI (Invitrogen) para teñir los núcleos. Se sembraron las células KR158 transfectadas con GFP-actina en portaobjetos de cámara de 8 pocillos, se dejaron volver a unir, y luego se trataron con concentraciones indicadas de SA. Se controlaron de forma continua las estructuras de actina durante un periodo de 16 horas usando microscopía confocal equipada con una cámara de crecimiento (37 °C, atmósfera humidificada y CO₂ al 5 %. Para comparar SA con los inhibidores de Rho/Rock, se trataron las células KR158 con GFP-actina con SA o con los inhibidores de la vía Rho, el inhibidor de Rock Y-27632 (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.), y el inhibidor de Rho C3 transferasa (Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, EE. UU., n.º cat. CT04) durante 16 horas, y luego se examinó por microscopía confocal.

35

40

45

50

Schweinfurthina A provoca cambios morfológicos reflejados en las alteraciones de la arquitectura dinámica de la actina. El tratamiento de células sensibles con SA da lugar a cambios en la morfología celular caracterizados por procesos alargados y contracción del citoplasma, lo que da como resultado una forma de huso global. Estos cambios se producen en el primer día de tratamiento produciéndose los cambios más dramáticos después de 12-18 horas. Hipotetizando que los cambios en el citoesqueleto de actina eran responsables de los cambios morfológicos, las células KR158 transfectadas de forma estable con GFP-actina se trataron por separado con el inhibidor de Rock Y-27632 o el inhibidor de Rho C3 transferasa, que se conoce que ambos interrumpen las estructuras citoesqueléticas de actina, o con SA. Cuando se comparó con controles no tratados, hubo una pérdida drástica de tinción con F-actina en todas las células tratadas, en especial las fibras de estrés. En las células tratadas con SA en particular, se observaron cambios dependientes de la dosis y del tiempo en la arquitectura de la actina, incluyendo la pérdida de fibras de estrés y el aumento de la actina cortical en los márgenes de la célula, 1. De manera distintiva, las células KR158 tratadas con doxorrubicina conservaron fibras de estrés cuando se les administraron dosis citotóxicas del agente intercalante de ADN, lo que sugiere que la reorganización de la estructura de actina no es una consecuencia general del estrés celular. Finalmente, los astrocitos primarios resistentes a SA y las células A549 no mostraron cambios visibles en la organización de actina después del tratamiento con SA como se visualiza por la tinción con faloidina.

55

60

65

EJEMPLO DE REFERENCIA 4

Este ejemplo demuestra la acción de schweinfurthina en las vías dependientes de Rho.

5 Se usaron los procedimientos generales del ejemplo de referencia 2 y el ejemplo de referencia 3 además de los procedimientos detallados a continuación.

10 Ensayo de despliegue (del inglés “pull-down”) de Rho GTPasa: El ensayo de despliegue de Rho se obtuvo de Upstate Biotech/Millipore (Billerica, MA, EE. UU., n.º cat. 17-294). Se recogieron las células KR158 a aproximadamente un 80 % de confluencia y se sembraron a 5×10^5 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Después de la recuperación durante la noche, se privaron de suero las células en FBS al 0,5 % durante 18 horas. Luego, se trataron las células con 10 ng/ml de EGF en presencia o bien en ausencia de las concentraciones indicadas de SA durante hasta 18 horas. En los puntos temporales indicados, se lisaron las células de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las proteínas desplegadas por las perlas de unión a Rho-GTP se eluyeron por SDS, se fraccionaron en un gel de SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Los lisados previos al despliegue se realizaron en paralelo para determinar los niveles totales de Rho en cada muestra. Se sondeó la membrana por un anticuerpo anti-Rho.

20 Schweinfurthina A inhibe la señalización de Rho inducida por el factor de crecimiento. Para probar si SA se podría dirigir a la red de señalización de Rho, se privaron de suero las células KR158 y luego se pulsaron con 10 ng/ml de EGF en presencia o ausencia de SA. Usando el dominio de unión de Rhotekin-Rho fusionado a GST para desplegar Rho activada, se observó una considerable inhibición de la actividad de Rho a las 12 horas y 18 horas en células pulsadas de EGF tratadas con SA. Como evidencia adicional de que se altera la vía de señalización de Rho, se inmunotñeron las células KR158 tratadas con SA y EGF para la fosforilación de Ser 19 en la cadena ligera de miosina 2 (MLC2), que está en dirección 3' de la señalización Rho/Rock. Se ha demostrado que la fosforilación de Ser 19 activa la función reguladora de MLC, y está asociada con la polimerización de la fibra de estrés y la contractilidad en el citoesqueleto de actina. Las micrografías confocales de estas células muestran una disminución dependiente de la dosis de la fosforilación de MLC en células tratadas con SA. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que los cambios citoesqueléticos observados en las células sensibles a SA se deben a la inhibición de la actividad de Rho, con consecuencias en dirección 3' en las moléculas efectoras Rho tales como MLC. Debido a que la evolución temporal de los experimentos muestra que los efectos sobre el citoesqueleto de actina, la fosforilación de MLC y la actividad de Rho requieren horas de tratamiento con SA, no es probable que SA esté actuando directamente dentro de la vía de Rho, sino que más bien actúa en dirección 5', indirectamente dando lugar a la regulación a la baja de la vía. Estos datos también sugieren que la pérdida de neurofibromina contribuye a la regulación al alza de una red de señalización que une la regulación del citoesqueleto de actina y la supervivencia celular, y que esta red regulada al alza en células deficientes en *Nf1* está dirigida por SA. Estos datos muestran que SA reemplaza funcionalmente la actividad de *Nf1* en células nulas *Nf1* inhibiendo la activación de Rho mediada por EGF.

40 EJEMPLO 5

Este ejemplo demuestra adicionalmente el efecto de schweinfurthinas en células NF1.

45 Se usaron los procedimientos generales de los ejemplos de referencia 2, 3 y 4 además de los procedimientos detallados a continuación.

Líneas celulares y cultivo: Se obtuvieron líneas celulares MPNST humanas (STS26T y T265) de Pediatric Oncology Branch, NCI (Bethesda, MD, EE. UU.).

50 Inmunoelctrotransferencia: Se recogieron los clones NF1-GRD de KR158 al 80 % de confluencia y se sembraron a una densidad celular de 5×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos, y se dejaron recuperar durante la noche. Luego se lisaron las células en tampón de lisis frío (Cell Signaling, Danvers, MA, EE. UU.) que contenía un cóctel inhibitor de proteasa. Se clarificaron los lisados (10.000 rpm x 15 min), y luego se determinaron sus concentraciones de proteína por el ensayo de BCA (Pierce, Rockford, IL, EE. UU.). Se cargaron cantidades iguales de proteína en un gel de SDS-PAGE, y se fraccionaron las proteínas. Se transfirieron las proteínas en el gel a una membrana de PDVF. Se confirmaron igual carga y éxito de transferencia por la tinción de Ponceau. Se bloqueó la membrana y luego se sondeó durante la noche con el anticuerpo KT3 para detectar el producto transgénico NF1-GRD. Se usó HRP de conejo como secundario, y se desarrollaron las bandas por quimioluminiscencia. Se despojaron las membranas y se volvieron a sondear.

65 Las células KR158 transfectadas con el dominio NF1-GRD son resistentes a schweinfurthina A. Debido a que la neurofibromina es una proteína muy grande, no eran factibles las células transfectadas de forma estable con el gen *Nf1* de longitud completa. Por lo tanto, para probar si se requería la pérdida de *Nf1* para la sensibilidad celular a SA, se volvió a introducir el fragmento NF1-GRD de ~300 aminoácidos de largo de *Nf1* en las células KR158. Si bien la neurofibromina puede tener funciones adicionales no mediadas por este dominio, este es un

fragmento clave de la proteína más grande. Las células transducidas con este dominio, o el vector vacío, se sometieron a prueba contra SA en un ensayo de proliferación celular de dos días. Como era de esperar, SA era muy activa tanto contra las células KR158 no transducidas como las transducidas del vector vacío; sin embargo, las células que expresan NF1-GRD eran resistentes a la inhibición de SA (figura 9). La secuenciación de la secuencia codificante correspondiente a los primeros 1984 aminoácidos de neurofibromina en células SF295 reveló 1 mutación sinónima en el extremo N-terminal de la proteína (Leu234CTG>CTA), mientras que las inmunoelectrotransferencias de SF-295 y A549 para neurofibromina mostraron una banda reactiva de 250 KD consistente con la expresión de neurofibromina en estas líneas celulares. La neurofibromina expresada en SF295 (o A549) puede no ser funcional; sin embargo, no se encontraron indicios claros de una mutación de *NF1* en SF295 que pudiera alterar la función de la proteína. Por lo tanto, los indicios sugieren que SA se dirige a una vía crítica para la supervivencia de las células nulas *NF1*, pero que esta vía también podría ser importante para la supervivencia de otros tumores del sistema nervioso que todavía pueden expresar neurofibromina, pero usan vías similares para la carcinogénesis. El examen de las células transducidas por microscopía confocal mostró que los clones que expresaban NF1-GRD tenían un patrón diferente de organización de F-actina a partir de células transducidas de vector vacío, y las estructuras de actina dentro de las células NF1-GRD no cambiaban en respuesta a SA. Las células transducidas de vector vacío mostraron la misma reorganización de estructuras de F-actina en respuesta a SA que se observó en células KR158 no transducidas y en otras líneas celulares sensibles sometidas a prueba.

Las células tumorales deficientes en *NF1* son diferencialmente sensibles a los efectos antiproliferativos de SA y análogos. Dada la dependencia de NF1-GRD de la sensibilidad de SA en células de astrocitoma, se sometieron a prueba dos líneas celulares de MPNST derivadas del ratón *NPcis*. Se observó una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de estas células (figura 10). Concordando con los efectos de SA en células de astrocitoma deficientes en *Nf1*, también se observó un efecto sobre el citoesqueleto de actina en las líneas celulares de MPNST, incluyendo pérdida de fibras de estrés y fosforilación de MLC reducida. Cuando se sometió a prueba SA contra la línea celular de MPNST humana T265, derivada de un paciente con *NF1*, también se observó una potente inhibición de la proliferación celular (figura 11). Por el contrario, cuando se midió el efecto de SA sobre una línea celular de MPNST esporádica, STS-26T, que se ha mostrado que expresa *NF1* wt, se observó una inhibición de la proliferación mucho más débil (figura 12). Cuatro análogos sintéticos de schweinfurthina A también inhibieron selectivamente el crecimiento de células deficientes en *Nf1* (figuras 13A, 13B y 14). (Se usó camptotecina como control positivo ya que se conoce que las células cancerosas, incluyendo las células A549, en general son sensibles a ella). Debido a que estos tumores no están protegidos por la barrera hematoencefálica, pueden ser un objetivo de la enfermedad de schweinfurthina independientemente de si las schweinfurthinas pueden cruzar la barrera hematoencefálica. Estos hallazgos apoyan aún más el modelo de que SA se dirige a una red de señalización que es esencial para la supervivencia de células tumorales en células deficientes en *NF1*.

La especificidad de schweinfurthina parece depender de la pérdida de actividad de neurofibromina, ya que los astrocitos primarios, naturales o bien *Nf1*^{-/+}; *Trp53*^{-/+}, son resistentes a la inhibición por schweinfurthina (figura 15). Este hallazgo sugiere que existen mecanismos intrínsecos dentro de las células tumorales que las hacen sensibles al compuesto, o que las células no transformadas son más eficaces para metabolizar el compuesto.

Las células *Nf1*^{-/+} a menudo muestran un fenotipo haploinsuficiente, y podrían tener un aumento de la susceptibilidad al tratamiento, en relación con las células normales. Estos datos sugieren que solo las células que han perdido o mutado la copia natural de *Nf1* serán sensibles a las schweinfurthinas.

Los pacientes con *NF1* portan una mutación en la línea germinal en el gen *NF1*, de manera que todas las células en el organismo tienen *NF1* disminuida. Existen muchos datos publicados sobre la hipersensibilidad de las células heterocigóticas *NF1* que suscita la preocupación de que las células "normales" de los pacientes con *NF1* puedan responder negativamente a las quimioterapias contra los tumores. Debido a que la schweinfurthina A muestra especificidad para las células nulas *NF1*, este compuesto puede mostrar una eficacia específica y más segura para el tratamiento de pacientes con *NF1*.

El uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (en especial en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se debe interpretar que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otro modo en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "comprender", "tener", "incluir" y "contener" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que quieren decir "incluyendo, pero sin limitarse a") a menos que se señale de otro modo. La enumeración de intervalos de valores en el presente documento pretende meramente servir como un procedimiento abreviado de hacer referencia individualmente a cada valor separado que se encuentre en el intervalo, a menos que se indique de otro modo en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se enumerara individualmente en el presente documento. Todos los procedimientos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otro modo en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, pretende meramente esclarecer mejor la invención y no supone una limitación en el

alcance de la invención, a menos que se reivindique de otro modo. No se debe interpretar ningún lenguaje en la memoria descriptiva como que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

5 por schweinfurthina (figura 15). Este hallazgo sugiere que existen mecanismos intrínsecos dentro de las células tumorales que las hacen sensibles al compuesto, o que las células no transformadas son más eficaces para metabolizar el compuesto.

10 Las células *Nf1*^{-/+} a menudo muestran un fenotipo haploinsuficiente, y podrían tener un aumento de la susceptibilidad al tratamiento, en relación con las células normales. Estos datos sugieren que solo las células que han perdido o mutado la copia natural de *Nf1* serán sensibles a las schweinfurthinas.

15 Los pacientes con *NF1* portan una mutación en la línea germinal en el gen *NF1*, de manera que todas las células en el organismo tienen *NF1* disminuida. Existen muchos datos publicados sobre la hipersensibilidad de las células heterocigóticas *NF1* que suscita la preocupación de que las células "normales" de los pacientes con *NF1* puedan responder negativamente a las quimioterapias contra los tumores. Debido a que la schweinfurthina A muestra especificidad para las células nulas *NF1*, este compuesto puede mostrar una eficacia específica y más segura para el tratamiento de pacientes con *NF1*.

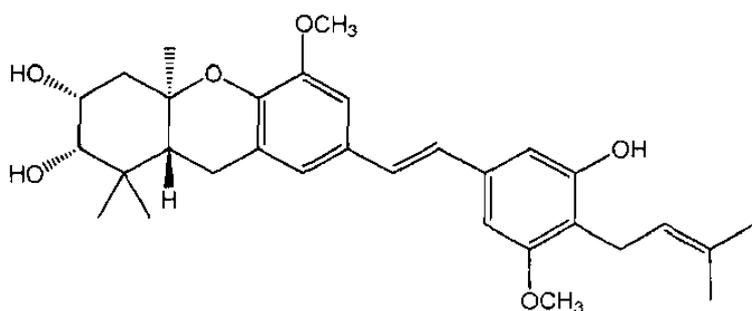
20 Todas las referencias, incluyendo las publicaciones, solicitudes de patentes y patentes citadas en el presente documento, se incorporan por el presente por referencia en la misma medida como si cada referencia se indicara individual y específicamente para ser incorporada por referencia y se expusiera en su totalidad en el presente documento.

25 El uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (en especial en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se debe interpretar que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otro modo en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "comprender", "tener", "incluir" y "contener" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que quieren decir "incluyendo, pero sin limitarse a") a menos que se señale de otro modo. La
 30 enumeración de intervalos de valores en el presente documento pretende meramente servir como un procedimiento abreviado de hacer referencia individualmente a cada valor separado que se encuentre en el intervalo, a menos que se indique de otro modo en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se enumerara individualmente en el presente documento. Todos los procedimientos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos
 35 que se indique de otro modo en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, pretende meramente esclarecer mejor la invención y no supone una limitación en el alcance de la invención, a menos que se reivindique de otro modo. No se debe interpretar ningún lenguaje en la memoria descriptiva como que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la
 40 invención.

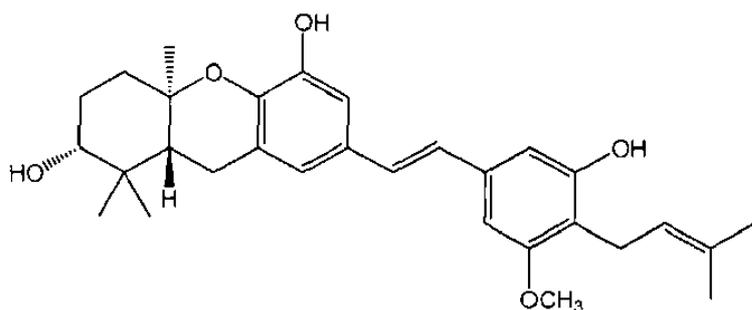
Los modos de realización preferentes de la presente invención se describen en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las variaciones de estos
 45 modos de realización preferentes se pueden volver evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos en la técnica empleen dichas variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de otro modo que como se describe específicamente en el presente documento. En consecuencia, la presente invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto enumerados en las reivindicaciones adjuntas a la misma según se permita por la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente
 50 en todas las variaciones posibles de los mismos está abarcada por la invención a menos que se indique de otro modo en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el compuesto es una schweinfurthina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en el que la schweinfurthina es schweinfurthina B, 5'-metilschweinfurthina E, o 5'-metilschweinfurthina G, para su uso en la prevención o tratamiento de una afección indeseable de neurofibromatosis tipo 1 en un sujeto portador de células homocigóticas nulas para el gen de neurofibromatosis tipo 1 o un sujeto que es haploinsuficiente para el gen de neurofibromatosis tipo 1.
2. El compuesto o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la schweinfurthina es schweinfurthina B.
3. El compuesto o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la schweinfurthina es 5'-metilschweinfurthina E.
4. El compuesto o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la schweinfurthina es 5'-metilschweinfurthina G.
5. El compuesto o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso en combinación con al menos un compuesto adicional que modula una vía de neurofibromatosis tipo 1.
6. El compuesto o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el uso combinado es el uso simultáneo o secuencial con la schweinfurthina, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable.
7. El compuesto o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el sujeto es un ser humano.
8. El compuesto o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la afección indeseable es un tumor.
9. El compuesto o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la afección indeseable es una afección del sistema nervioso periférico.
10. El compuesto o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la afección indeseable es un tumor maligno de la vaina del nervio periférico (MPNST).
11. Un compuesto de la fórmula



o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o un compuesto de la fórmula



45

o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. Una composición farmacéutica que comprende (a) un compuesto de la reivindicación 11 o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5

13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en la que la composición comprende además al menos un compuesto adicional que inhibe una vía ras.

Figura 1

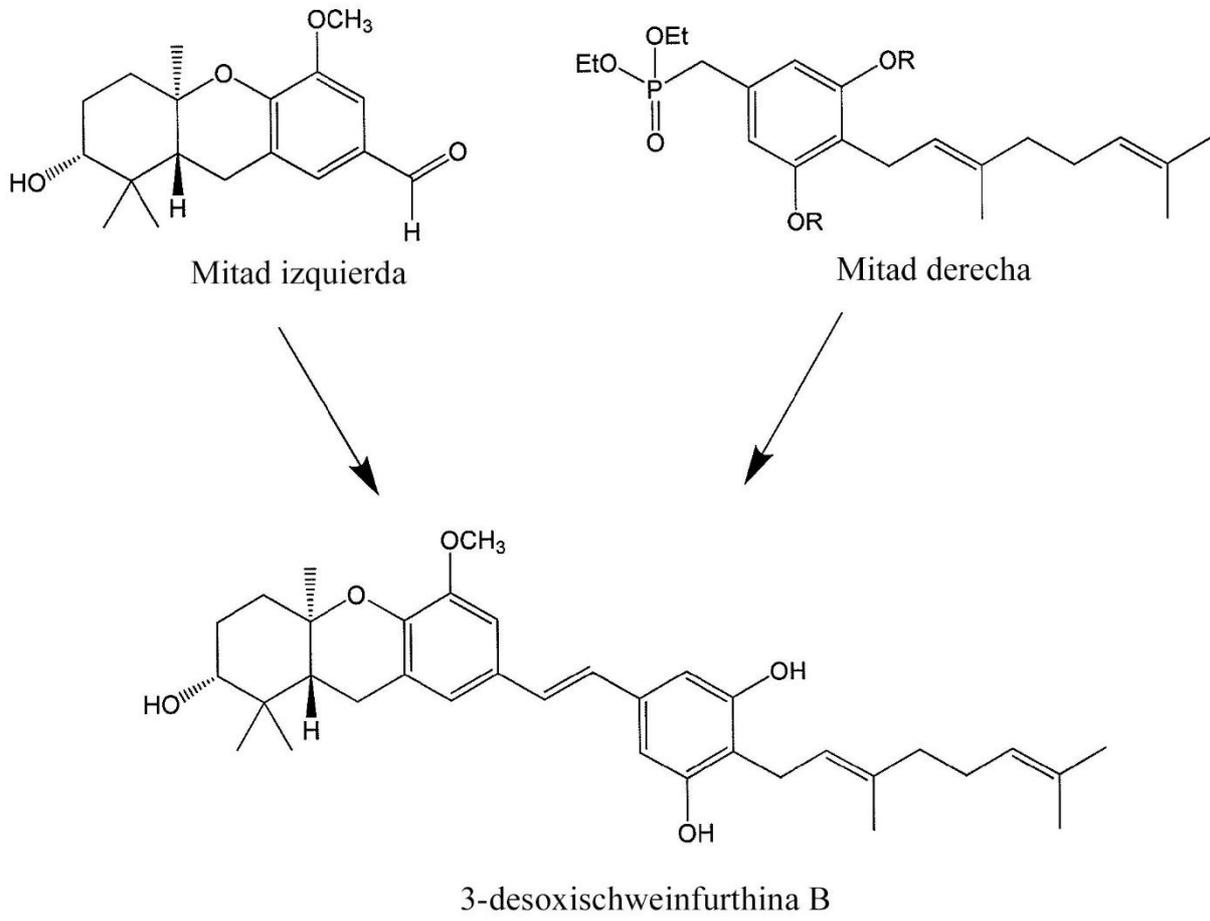


Figura 2A

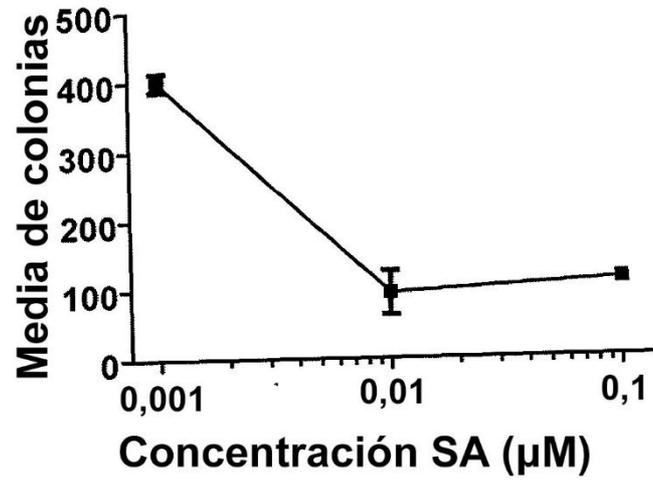


Figura 2B

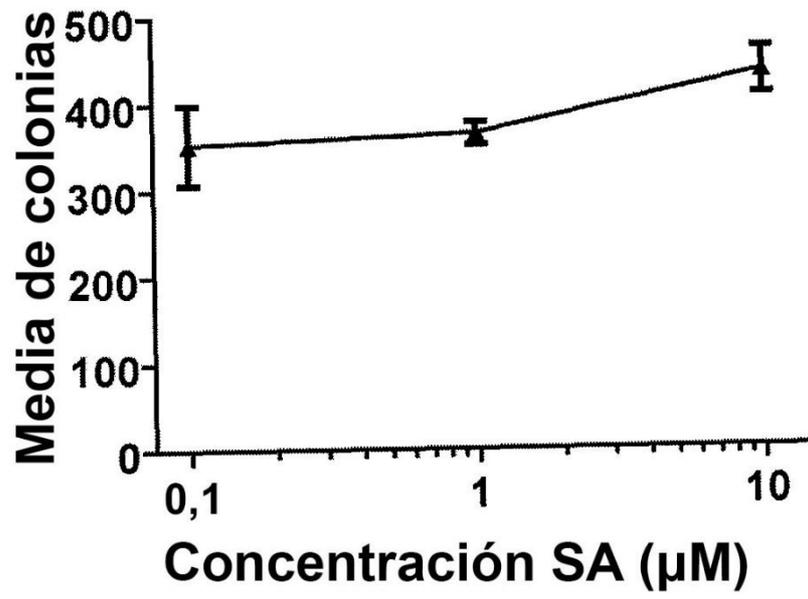


Figura 3

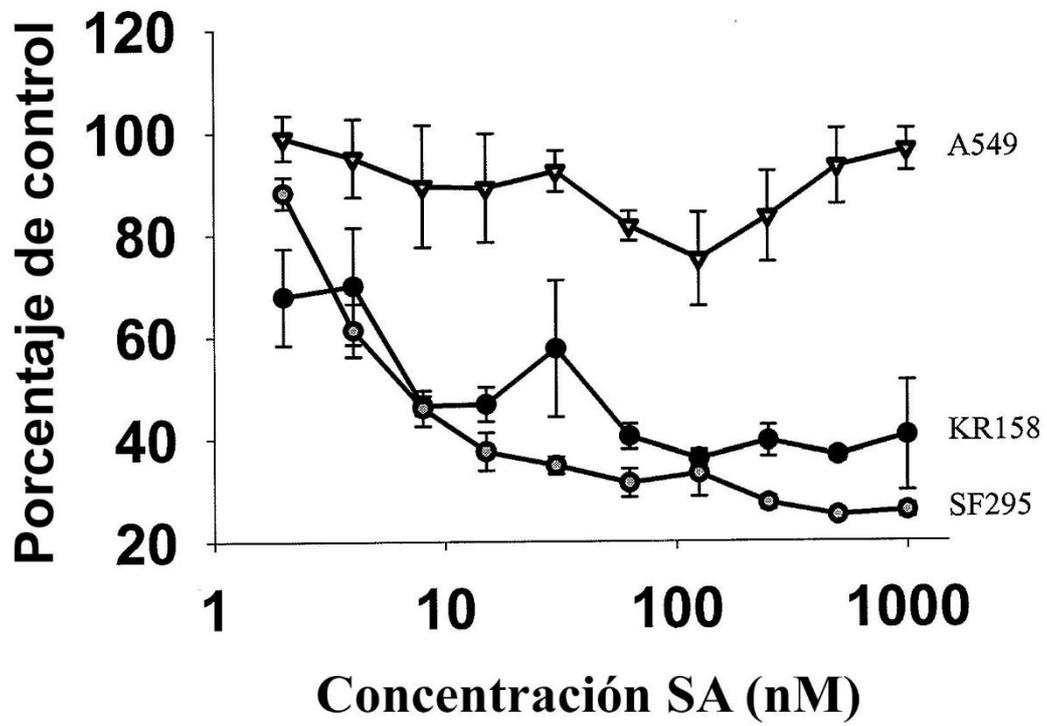


Figura 4

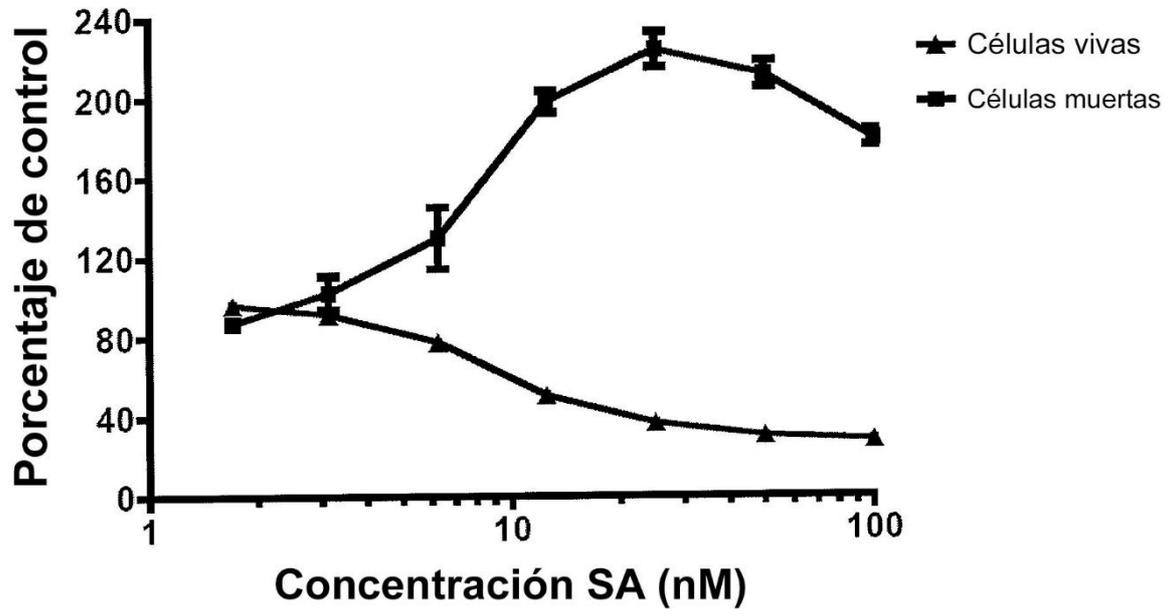


Figura 5

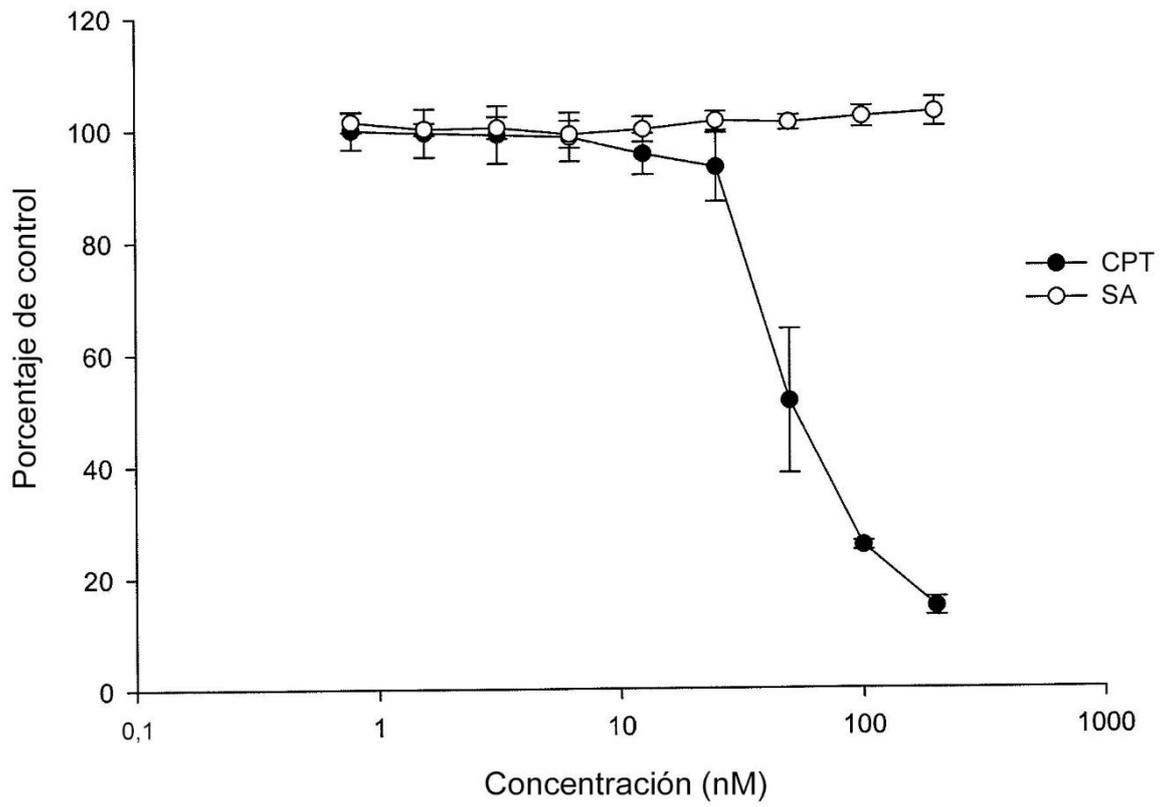


Figura 6

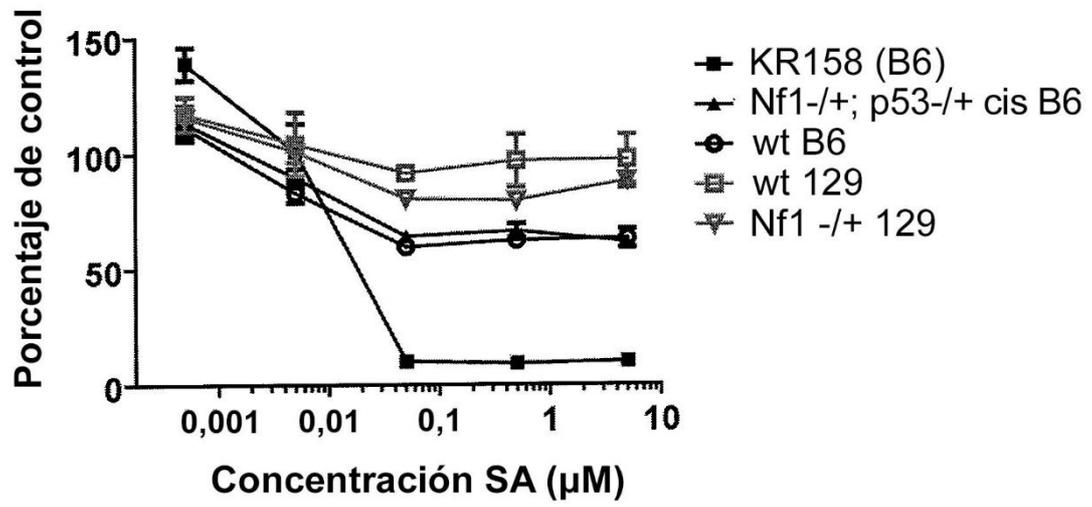


Figura 7

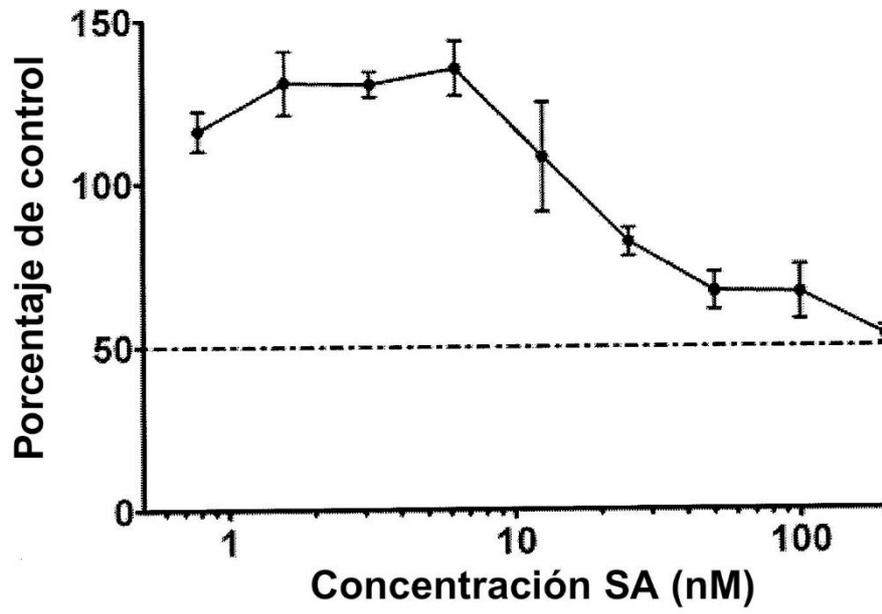


Figura 8

**Tiempo de duplicación de NCI60
frente a respuesta a schweinfurthina**

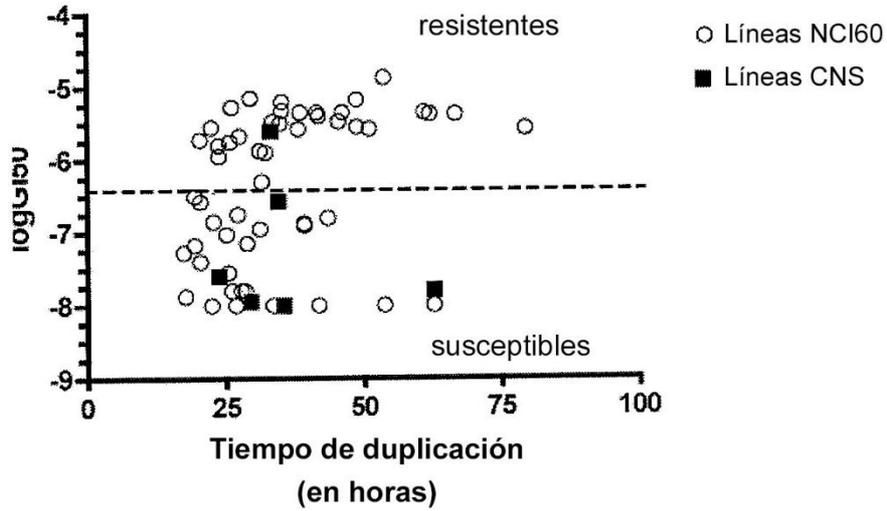


Figura 9

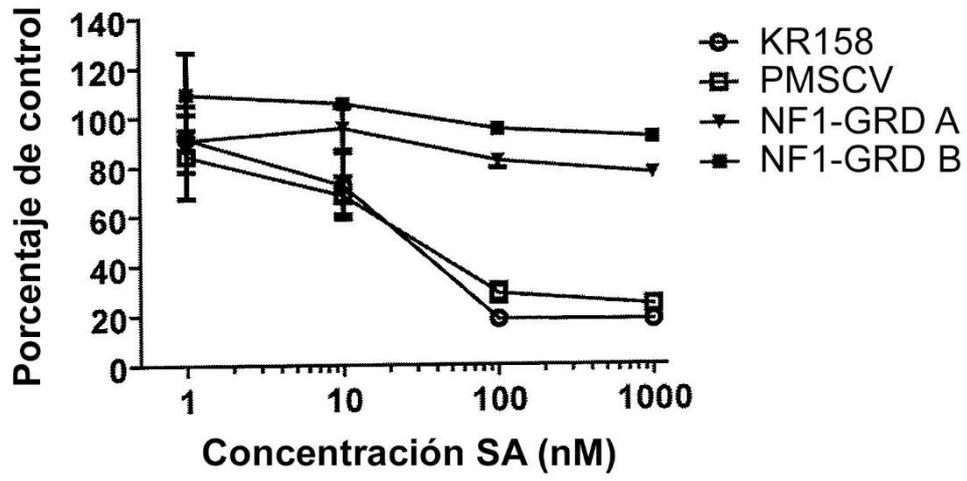


Figura 10

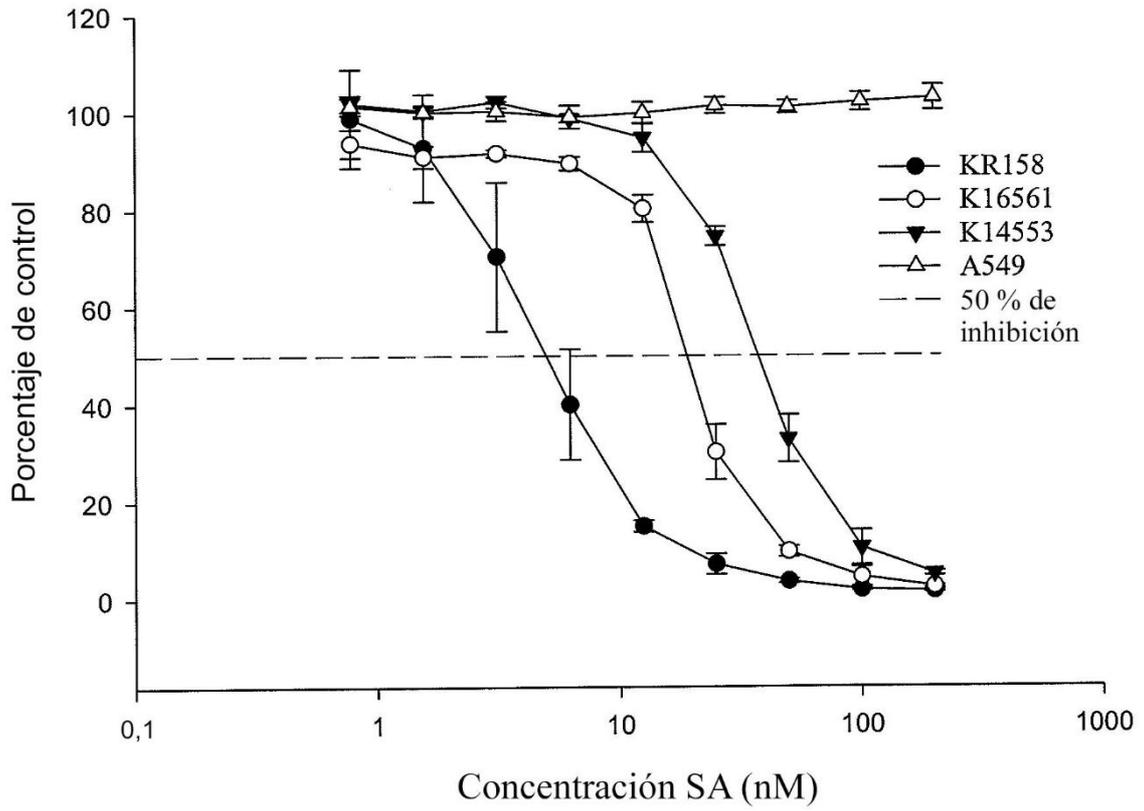


Figura 11

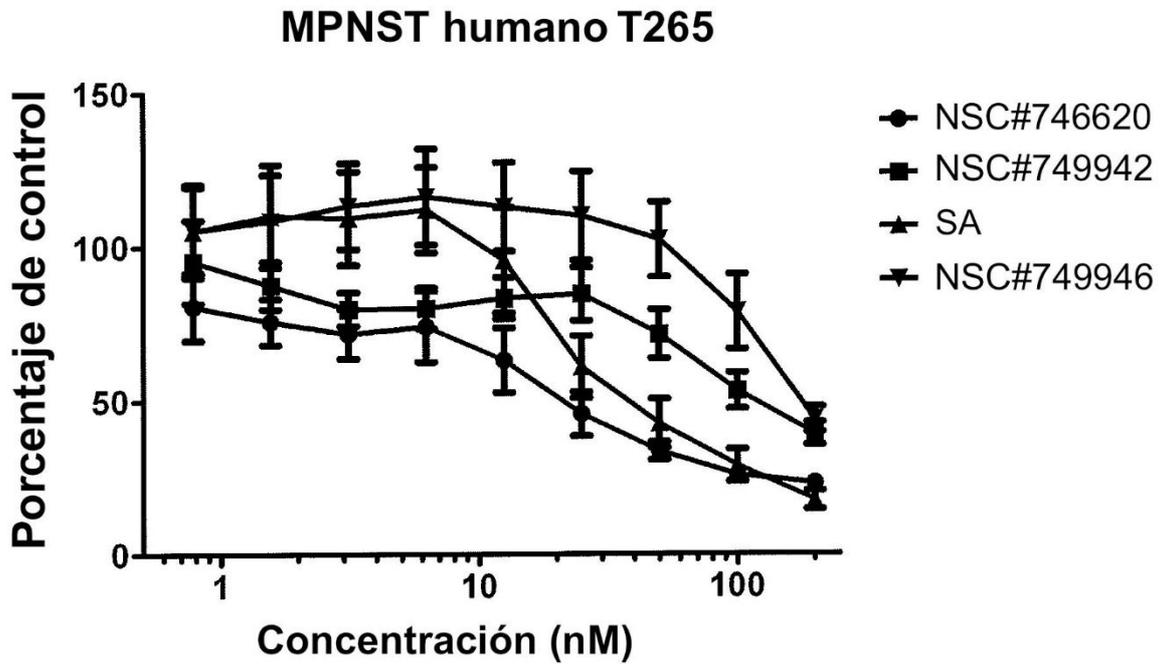


Figura 12

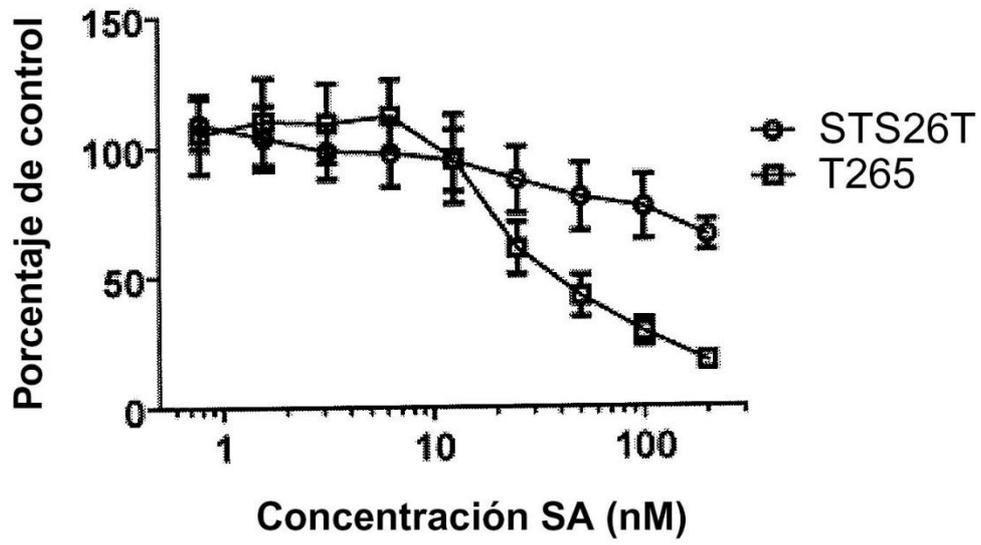


Figura 13A

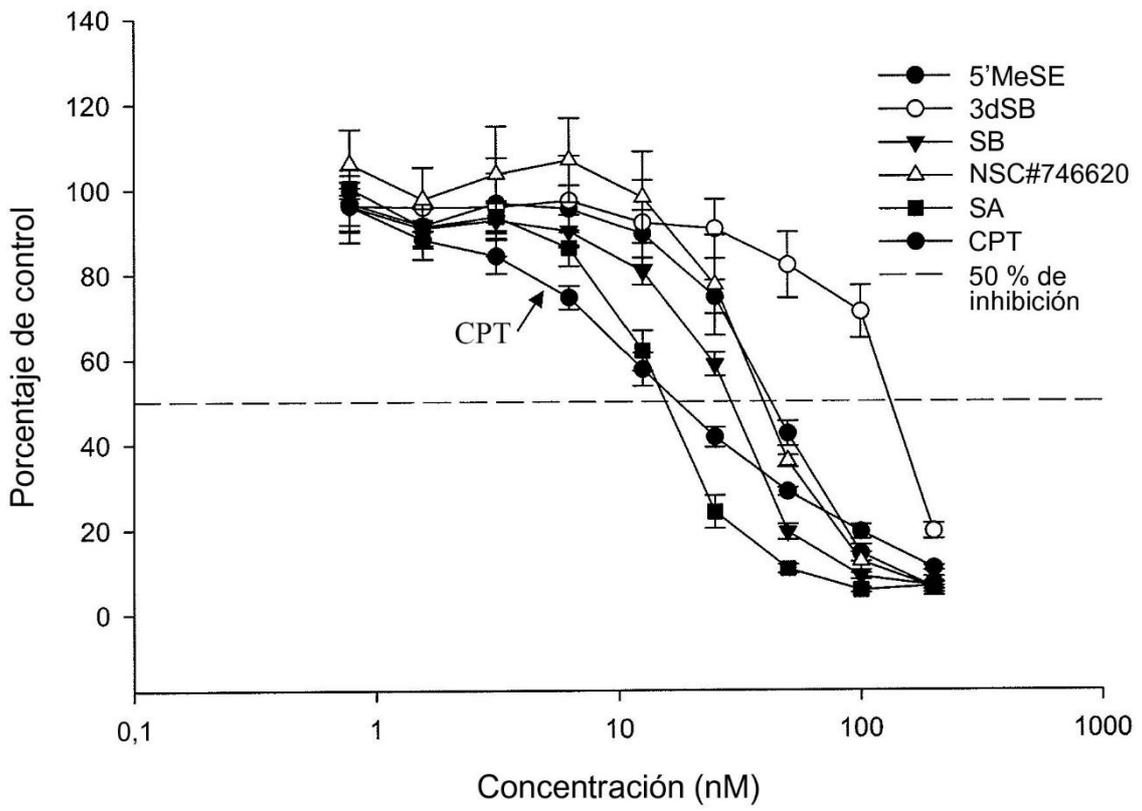


Figura 13B

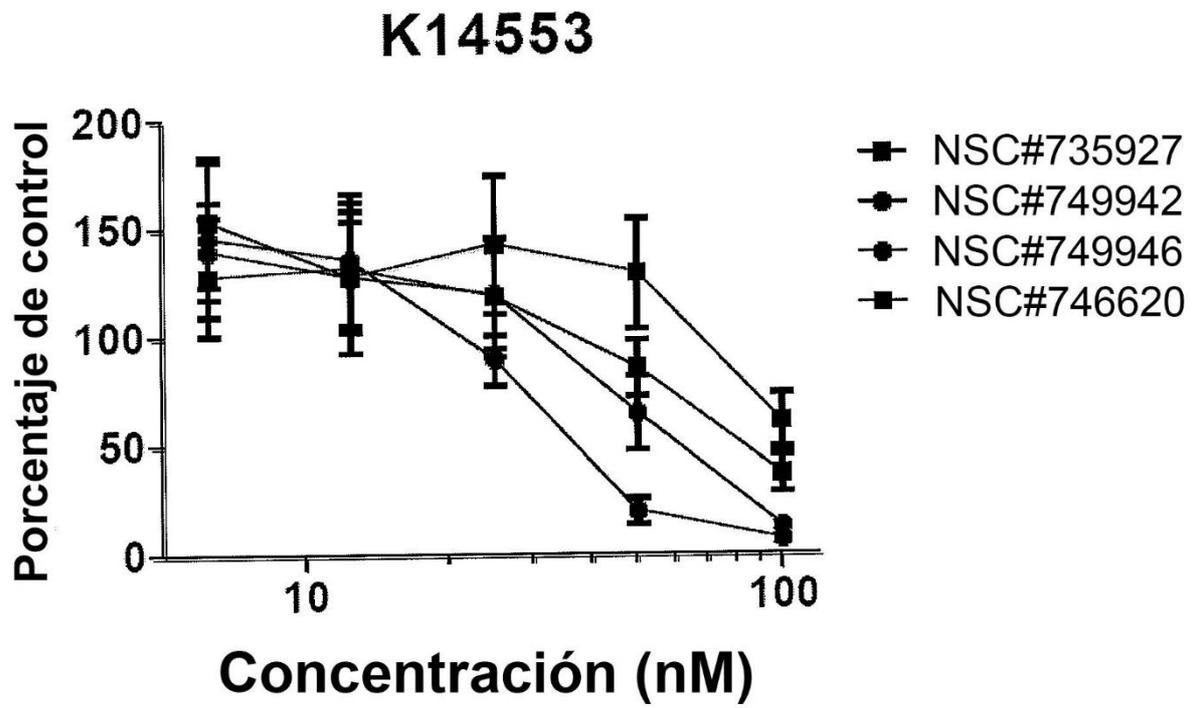


Figura 14

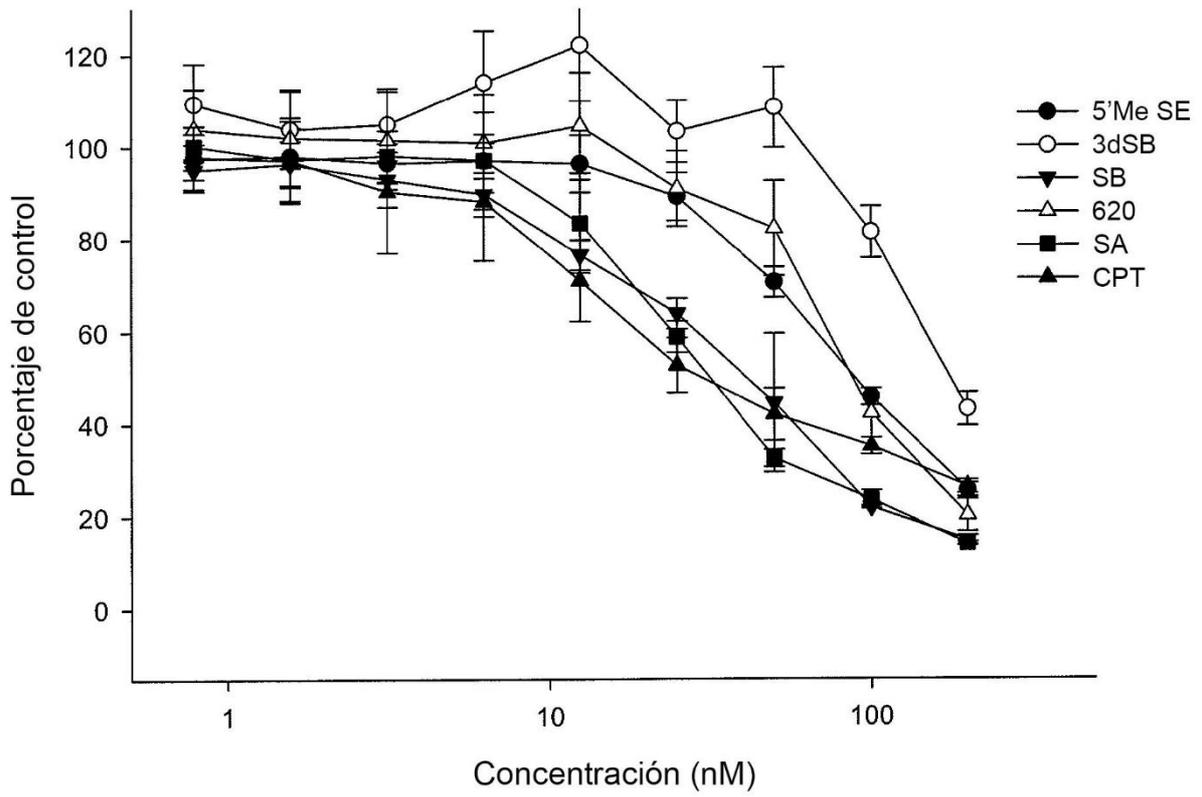


Figura 15

