

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 445**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/553** (2006.01)  
**A61K 31/00** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2008.01)  
**A01N 43/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2014 PCT/US2014/068373**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2015 WO15084958**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2014 E 14867137 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 3077544**

54 Título: **Diseño basado en la racionalidad de una terapia específica para el cáncer**

30 Prioridad:  
**03.12.2013 US 201361911423 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.11.2019**

73 Titular/es:  
**CELESTRA LIFE SCIENCE LLC (100.0%)  
3018 Crossfield Road  
Richmond VA 23233, US**

72 Inventor/es:  
**LEE, ALLEN, J.;  
LEE, JASON, J.;  
LU, DAVID, M. y  
LEE, RUEY-MIN**

74 Agente/Representante:  
**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 732 445 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

Diseño basado en la racionalidad de una terapia específica para el cáncer

## 5 Referencia cruzada

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos núm. 61/911,423, presentada el 3 de diciembre de 2013

## 10 Antecedentes de la invención

La degradación de la proteína mediada por la ubiquitina ocurre generalmente a través de la ruta del proteosoma de la ubiquitina. En esta ruta, las ligasas de la proteína-ubiquitina (por ejemplo, ligasas E3) se dirigen a las proteínas seleccionadas para la degradación uniendo las cadenas de la ubiquitina a las proteínas a degradar. La ubiquitinación permite que las proteínas se reconozcan por un complejo de proteosoma, que degrada después a las proteínas. La proteína POZ de tipo moteado (SPOP) se ha implicado en la degradación de las proteínas objetivo mediada por la ubiquitina al cumplir la función de reconocimiento del sustrato.

La SPOP comprende generalmente dos dominios: un dominio MATH y un dominio poxvirus y dedos de zinc (POZ), denominado de forma alternativa dominio BTB. La estructura general de la SPOP se ilustra en la Figura 1. Las proteínas SPOP típicamente reclutan los sustratos de las proteínas (por ejemplo, sustratos de SPOP) hacia las ligasas de la ubiquitina E3 a través de sus dominios MATH y POZ. Los sustratos de SPOP típicamente forman complejos con el dominio MATH de las proteínas SPOP, mientras que la ligasa de la ubiquitina E3 Cullin-3 interactúa con el dominio POZ. El reclutamiento de los sustratos de SPOP hacia la ligasa de la ubiquitina E3 tipo Cullin-3 mediado por la SPOP facilita la ubiquitinación de los sustratos de SPOP mediada por E3, dirigiéndose, por lo tanto, a los sustratos para la degradación proteosomal.

La secuenciación del exoma de tumores de próstata humanos reveló que un subconjunto de tumores de próstata comprende mutaciones de SPOP (Nature Genetics 2012; 44: 685–689). En total, se encontró que las mutaciones de SPOP estaban presentes en el 6-15% de los tumores de próstata en el estudio (Nature Genetics 2012; 44: 685–689). Curiosamente, todas las mutaciones de SPOP identificadas que se asociaron con tumores de próstata se encontraban dentro del bolsillo de unión al sustrato de SPOP (Nature Genetics 2012; 44: 685–689), lo que indica que dichas mutaciones pueden afectar la unión del sustrato de SPOP y su posterior ubiquitinación (Proc Natl Acad Sci USA. 2013 110: 6997-7002). Se informó que la proteína SRC-3 estaba sobreexpresada en el 38% de las muestras tumorales de cáncer de próstata (Br J Cancer. 2001; 85: 1928-36). Otro estudio demostró que se requiere la expresión de SRC-3 para la proliferación y supervivencia de las células del cáncer de próstata y sus niveles se correlacionan con el antígeno prostático específico (PSA). En un lote de muestras de cáncer de próstata de pacientes con prostatectomía, se demostró que el tumor con alta expresión de SRC3 se correlaciona con una menor supervivencia sin recurrencia (Cancer Res. 2005 Sep 1; 65(17):7976-83). Estos estudios sugieren un papel importante de SRC-3 en la formación de cáncer de próstata y se considera como un factor de mal pronóstico. Además, las mutaciones de la SPOP asociadas con el cáncer de próstata impiden la capacidad de la SPOP para inducir la degradación de SRC-3 dependiente de la ubiquitina (Proc Natl Acad Sci USA. 2013 110: 6997-7002). Se ha demostrado además que SRC3 se amplifica en el cáncer de mama, tanto a nivel genético como a nivel de transcripción (Nature Reviews Clinical Oncology 2010; 7:83-89). Por ejemplo, en un estudio, el 58% de las biopsias de tumores de mama exhiben niveles elevados de expresión del gen SRC3. Los niveles elevados de SRC3 se asocian además con una serie de otros tipos de cáncer. Además del cáncer de mama y el cáncer de próstata, se demostraron niveles elevados de SRC3 en el cáncer de páncreas y el cáncer gástrico.

El análisis mutacional y expresivo de la SPOP se realizó por Kim y otros, (APMIS. 2013; 121: 626-33) en 45 muestras de cáncer gástrico, 45 de cáncer colorrectal y 45 de cáncer de próstata mediante polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP). Además, analizaron también la expresión de la proteína SPOP en 60 muestras de tumores de cáncer gástrico, 60 de cáncer colorrectal y 60 de cáncer de próstata mediante inmunohistoquímica. Tres mutaciones somáticas de sentido erróneo (2 en el cáncer de próstata y una en el cáncer colorrectal) del gen SPOP en las secuencias codificantes (Ser14Leu, Tyr87Cys y Phe133Leu) estaban todas ubicadas en el dominio N-terminal de unión al sustrato. En la inmunohistoquímica, la proteína SPOP se expresó en las células epiteliales gástricas, colónicas y de próstata normales, mientras que la pérdida de SPOP se encontró en el 30% de cáncer gástrico, 20% de cáncer colorrectal y 37% de cáncer de próstata.

La RC3 también desempeña un papel crítico en el cáncer de mama y otras neoplasias malignas (Science 1997; 277: 965-8, Ann Oncol. 2013; 24: 1414). En un estudio informado por Burandt (Breast Cancer Res Treat. 2013 137: 745-53), se analizaron 2.197 muestras de carcinomas de mama y la sobreexpresión de SRC3 mediante perfiles de genes e inmunohistoquímica (IHC) se asoció con el tamaño del tumor, alto grado histológico, supervivencia global específica a la enfermedad pobre. La amplificación de AIB1 por hibridación fluorescente in situ (FISH) se encontró en el 11% de los carcinomas. Se asoció con alto grado histológico, compromiso de los ganglios linfáticos y pobre supervivencia específica a la enfermedad (Breast Cancer Res Treat. 2013 137: 745-53).

La amplificación de SRC3 se observó en el 7% y la sobreexpresión en el 40% de las muestras de cáncer gástrico (Int J Cancer. 2000; 89: 217-23). La amplificación de SRC3 coincidió generalmente con su sobreexpresión y se asoció con un mal pronóstico. Curiosamente, 15/86 (17,4%) casos de adenocarcinomas gástricos fueron positivos para el receptor de andrógenos (J. Can. Res. Clin. Onc. 2004; 130: 253-258). Los pacientes con tumores AR positivos (AR+) tuvieron un pronóstico significativamente peor que los pacientes (AR-) (mediana de la supervivencia de 9 meses frente a 24 meses, P = 0,03).

Un nuevo objetivo receptor de estrógeno (ER) se identificó como DEK, cuya expresión promueve además la proliferación inducida por el estrógeno en las células de cáncer de mama. El agotamiento de DEK mejora la muerte celular inducida por el tamoxifeno en las líneas celulares de cáncer de mama ER+ (PLoS ONE 2012; 7: e46985). DEK fue identificado previamente como una proteína remodeladora del ADN. DEK regula la respuesta al daño del ADN y la reparación de la señalización. DEK funciona como un factor transcripcional y se informa además que es un oncogén y se expresa de manera ubicua en casi todos los órganos y tumores (Nucleic Acids Res. 2011; 39: 7465-76). DEK protege a las células tumorales de los agentes dañinos del ADN y la muerte celular a través de mecanismos dependientes e independientes de p53 al facilitar la reparación de la rotura del ADN de doble cadena. La alta expresión de DEK se asoció con un mal pronóstico en el cáncer gástrico (Diagn. Pathol. 2014; 9: 67).

Lestaurtinib es un derivado de indolocarbazol que se encontró originalmente como un inhibidor de varias quinasas receptoras, incluyendo JAK2 (IC<sub>50</sub> = 0.9 nM), PDGFβ (IC<sub>50</sub> = 216 nM), STAT3 (IC<sub>50</sub> = 10-30 nM), TRKB (IC<sub>50</sub> = <25 nM), PRK1 (IC<sub>50</sub> = 8.6 nM), y PKC (IC<sub>50</sub> = 226 nM) y FLT3 (Cancer Res. 1999; 59: 2395-401, Blood. 2002; 99: 3885-91). Debido a su actividad inhibitoria del receptor quinasa, se propuso el lestaurtinib como un agente terapéutico potencial para el cáncer de próstata. Sin embargo, un ensayo clínico en Fase 2 en humanos demostró que el tratamiento con lestaurtinib de pacientes con cáncer de próstata no logró el objetivo clínico primario de la reducción de los niveles de PSA (Cancer Biol Ther. 2007; 6: 1360-7). Después de esto, el desarrollo clínico muy limitado ha estado en curso para lestaurtinib.

#### Breve descripción de la invención

Las composiciones de la invención se relacionan con el descubrimiento de que el lestaurtinib puede reducir los niveles de expresión y/o la actividad de un sustrato de SPOP o la de su objetivo en la ruta corriente abajo.

Por consiguiente, la invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de un tumor de próstata, un tumor de mama o un tumor gástrico en un sujeto mediante la regulación descendente de la señalización del sustrato de la proteína POZ de tipo moteado (SPOP) en un sujeto que lo necesita, cuyo uso comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, regulando de ese modo negativamente la señalización del sustrato de SPOP en el sujeto, en donde el sujeto presenta un nivel aberrantemente alto de un sustrato de SPOP o actividad de sustancia SPOP en comparación con un sujeto control.

En algunas modalidades, el sustrato se selecciona del grupo que consiste en SRC1, SRC2, SRC3, Daxx, Gli, AWP-1, cullin-4B, cullin-7 y DEK. En algunas modalidades, el sustrato es SRC1, SRC2 o SRC3. En algunas modalidades, el sustrato es SRC3. En algunas modalidades, el sustrato es DEK.

En algunas modalidades, la regulación negativa comprende disminuir un nivel y/o actividad del sustrato de SPOP u objetivo del sustrato corriente abajo. En algunas modalidades, la regulación negativa se evidencia mediante una reducción en la actividad del objetivo corriente abajo en una célula derivada del sujeto. En algunas modalidades, el objetivo corriente abajo es PRK-1. En algunas modalidades, la regulación negativa comprende disminuir un nivel y/o actividad del sustrato de SPOP. En algunas modalidades, la regulación negativa se evidencia mediante una reducción en un nivel del sustrato en una célula derivada del sujeto. En algunas modalidades, el nivel comprende un nivel de expresión. En algunas modalidades, el nivel de expresión es un nivel de expresión de proteína. En algunas modalidades, el nivel de expresión se evidencia por un nivel de un transcrito del sustrato de SPOP. En algunas modalidades, la regulación negativa se evidencia mediante una reducción en un nivel del sustrato en una fracción citoplásmica de la célula.

La invención proporciona además una composición para su uso en un método para tratar un tumor de próstata en un sujeto que lo necesita, que comprende: administrar al sujeto una primera dosis de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; determinar un nivel de sustrato de SPOP o su actividad en una muestra biológica derivada del sujeto; y administrar una dosis adicional de la composición farmacéutica si el nivel de sustrato o su actividad se reduce en comparación con un sujeto control al que no se administra una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención proporciona además una composición para su uso en un método para tratar un tumor de próstata en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el sujeto presenta un nivel aberrantemente alto de un sustrato de SPOP o su actividad en comparación con un sujeto control.

- En algunas modalidades, el nivel aberrantemente alto se evidencia por la presencia de una mutación de SPOP en el tumor. En algunas modalidades, la mutación resulta en una secuencia de aminoácidos alterada entre las posiciones 31-161 de la secuencia de aminoácidos de SPOP. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos alterada comprende una sustitución de aminoácido. En algunas modalidades, la mutación causa una sustitución en Y87, F102, S119, F125, K129, W131, F133 y/o K134 de la secuencia de aminoácidos de SPOP. En algunas modalidades, la mutación causa una sustitución Y87C, una sustitución Y87N, una sustitución F102C, una sustitución S119N, una sustitución F125V, una sustitución K129N, una sustitución W131G, una sustitución F133L, una sustitución F133V, o cualquier combinación de sus sustituciones.
- Al practicar cualquiera de los métodos en la presente descripción, el sujeto puede ser un humano. En algunas modalidades, el sujeto evidencia un síntoma de una enfermedad. En algunas modalidades, la enfermedad es una enfermedad de la próstata. En algunas modalidades, la enfermedad es un tumor de la próstata. En algunas modalidades, el tumor de próstata es sensible a los andrógenos. En algunas modalidades, el tumor de próstata es insensible a los andrógenos. En algunas modalidades, el tumor de próstata es sensible al estrógeno. En algunas modalidades, el tumor de próstata es insensible al estrógeno. En algunas modalidades, la enfermedad es una enfermedad mamaria o gástrica. En algunas modalidades, la enfermedad es un tumor de mama o gástrico. En algunas modalidades, el tumor de mama o gástrico es sensible a los andrógenos. En algunas modalidades, el tumor de mama o gástrico es insensible a los andrógenos. En algunas modalidades, el tumor de mama o gástrico es sensible al estrógeno. En algunas modalidades, el tumor de mama o gástrico es insensible al estrógeno.
- La invención proporciona además una composición para su uso en un método para regular de forma descendente un nivel de sustrato de SPOP o su actividad en una célula de próstata, que comprende: administrar a la célula una cantidad eficaz de lestaurtinib, que de ese modo regula negativamente el sustrato de SPOP o su actividad en la célula; y evaluar la regulación negativa del nivel de sustrato SPOP o su actividad en la célula de la próstata.
- En algunas modalidades, la célula de próstata es una célula de cáncer de próstata. En algunas modalidades, la célula de próstata es una célula de próstata sensible a andrógenos. En algunas modalidades, la célula de próstata es una célula de próstata sensible al estrógeno. En algunas modalidades, la célula de próstata es una célula LNCaP.
- La presente proporciona además una composición para su uso en un método para regular negativamente un nivel de sustrato de SPOP o su actividad en una célula mamaria o gástrica, que comprende: (a) administrar a la célula una cantidad efectiva de lestaurtinib, que de ese modo regula negativamente el sustrato SPOP o su actividad en la célula; y (b) evaluar la regulación negativa del nivel de sustrato de SPOP o su actividad en la célula mamaria o gástrica.
- En una modalidad separada pero relacionada, la presente invención proporciona una composición para su uso en un método para tratar un tumor de mama o gástrico en un sujeto que lo necesita, que comprende: (a) administrar al sujeto una primera dosis de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo; (b) determinar un nivel de sustrato de SPOP o su actividad en una muestra biológica derivada del sujeto; y (c) administrar una dosis adicional de la composición farmacéutica si el nivel de sustrato o su actividad se reduce en comparación con un sujeto control al que no se administra una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- En aun otra modalidad, la presente invención proporciona una composición para su uso en un método para tratar un tumor de mama o gástrico en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el sujeto exhibe un nivel aberrantemente alto de un sustrato de SPOP o su actividad en comparación con un sujeto control.
- En aun otra modalidad todavía, la presente invención proporciona una composición para su uso en un método para tratar un tumor de mama o gástrico en un sujeto que lo necesita, que comprende: (a) administrar al sujeto una primera dosis de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo; (b) determinar un nivel de sustrato de SPOP o su actividad en una muestra biológica derivada del sujeto; y (c) administrar una dosis adicional de la composición farmacéutica si el nivel de sustrato o su actividad se reduce en comparación con un sujeto control al que no se administra una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- En algunas modalidades, la célula mamaria o gástrica es una célula de cáncer de mama o gástrico primario o de cualquier otra manera una célula cultivada. En algunas modalidades, la célula mamaria o gástrica es una célula sensible al andrógeno o al estrógeno. En algunas modalidades, el sustrato se selecciona del grupo que consiste en SRC1, SRC2, SRC3 (Oncogene 2011; 30: 4350-64) (Nat Rev Cancer. 2009; 9: 615-30), Daxx (J Biol Chem. 2006; 281: 12664-72), Gli (Dev Cell. 2006; 10: 719-29), AWP-1, cullin-4B, cullin-7 (Oncogene 2011; 30: 4350-64) y DEK.

## Breve descripción de los dibujos

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención se obtendrá por referencia a la siguiente descripción detallada que expone las modalidades ejemplares, en las que se utilizan los principios de la invención, y las figuras adjuntas en las que:

La Figura 1 representa la estructura de la proteína SPOP y los sitios de mutaciones ejemplares de SPOP.

La Figura 2 representa la supresión del crecimiento celular por lestauritinib y su homólogo estaurosporina (STS) en 3 líneas celulares de cáncer de próstata: PC3 (Figura 2A), 22RV1 (Figura 2B) y el clon de LNCaP FGC (Figura 2C).

La Figura 3 representa la supresión del crecimiento celular por lestauritinib y su homólogo estaurosporina (STS) en 3 líneas celulares de cáncer de mama: MCF7 (Figura 3A), BT-474 (Figura 3B) y ZR-75-1 (Figura 3C).

La Figura 4 representa la supresión del crecimiento celular por lestauritinib y su homólogo estaurosporina (STS) en 4 líneas celulares de cáncer de gástrico: AGS (Figura 4A), MKN-45 (Figura 4B), Hs746T (Figura 4C) y NCI-N87 (Figura 4D).

La TABLA 1 representa una tabla resumen para el IC<sub>50</sub> de lestauritinib en todas las líneas celulares de cáncer analizadas.

La Figura 5 muestra el impacto de lestauritinib en los niveles de expresión de proteínas SRC-3 y PRK1 en las líneas celulares de cáncer de próstata.

La Figura 6 muestra un modelo de trabajo de la regulación de la actividad transcripcional AR en las células con SPOP de tipo silvestre versus mutante.

La Figura 7 representa el impacto de dosis-respuesta de lestauritinib sobre los niveles de expresión de las proteínas SRC3 (Figuras 7A y 7B) y DEK (Figuras 7A y 7C) en dos células de cáncer de próstata.

La Figura 8 representa el impacto de dosis-respuesta de lestauritinib sobre los niveles de expresión de las proteínas SRC3 (Figuras 8A y 8B) y DEK (Figuras 8A y 8C) en dos células de cáncer de mama.

La Figura 9 representa el impacto de dosis-respuesta de lestauritinib sobre los niveles de expresión de las proteínas SRC3 (Figuras 9A y 9B) y DEK (Figuras 9A y 9C) en dos células de cáncer gástrico.

La Figura 10 representa la secuencia de aminoácidos de la SPOP humana.

## Descripción detallada de la invención

## Técnicas generales:

La práctica de la presente descripción empleará, a menos que se indique de cualquier otra manera, técnicas convencionales de inmunología, bioquímica, química, biología molecular, microbiología, biología celular, genómica y ADN recombinante, que están dentro de la experiencia en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 4<sup>a</sup> edición (2012); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M. Ausubel, y otros Eds., (1987)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds. (1995)), y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Como se usa en la descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células, que incluyen sus mezclas.

## Definiciones

Los términos “polipéptido”, “péptido”, y “proteína” se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a los polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede interrumpirse por no-aminoácidos. Los términos incluyen además un polímero de aminoácidos que se ha modificado; por ejemplo, la formación de enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación, tal como la conjugación con un componente marcado. Como se usa en la presente el término “aminoácido” se refiere a los aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen glicina y ambos isómeros ópticos D y L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos.

El término “aminoácido”, como se usa la presente descripción, incluye los aminoácidos sintéticos y de origen natural, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican después, por ejemplo,  $\gamma$ -carboxiglutamato, hidroxiprolina, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono  $\alpha$  que se une a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R. Los ejemplos de análogos de aminoácidos incluyen, entre otros, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina y metilsulfonio de metionina. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, siempre que conserven la misma estructura química básica de un aminoácido de origen natural. Los “miméticos de aminoácidos” se refieren a los compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido de origen natural.

Los aminoácidos pueden referirse en la presente descripción ya sea por los símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

En el contexto de los polipéptidos, una “secuencia” es un orden de aminoácidos en un polipéptido en una dirección de terminal amino a carboxilo en la que los residuos que se unen entre sí en la secuencia son contiguos en la estructura primaria del polipéptido.

Los términos “polinucleótidos”, “ácido nucleico”, “nucleótidos” y “oligonucleótidos” se usan indistintamente. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o no. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones codificantes o no de un gen o fragmento génico, loci (locus) definidos por el análisis de enlace, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si se presenta, las modificaciones en la estructura de nucleótidos puede darse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse además después de la polimerización, tal como mediante la conjugación con un componente marcador.

Como se usa en la presente, el término “expresión” se refiere al proceso mediante el cual se transcribe un polinucleótido en ARNm, y/o el proceso mediante el cual el ARNm transcrito (referido también como “transcripto”) se traduce posteriormente a péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcriptos y/o los polipéptidos codificados pueden evaluarse según la lectura para el nivel de expresión. Si el polinucleótido se deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir corte y empalme del ARNm en una célula eucariota.

El término “cantidad efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de un compuesto descrito en la presente descripción que es suficiente para llevar a cabo la aplicación prevista, que incluye pero no se limita al tratamiento de la enfermedad, como se define más abajo. La cantidad terapéuticamente eficaz variará en dependencia de la aplicación prevista (in vitro o in vivo), o el sujeto y la condición de la enfermedad que se trata, por ejemplo, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la condición de la enfermedad, la forma de administración y similares, que pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica. El término se aplica además a una dosis que inducirá una respuesta particular en las células objetivo, por ejemplo, la reducción de la adhesión de plaquetas y/o la migración celular. La dosis específica variará en dependencia de los compuestos particulares elegidos, el régimen de dosificación a seguir, si se administra en combinación con otros compuestos, el intervalo de tiempo de la administración, el tejido al que se administra y el sistema físico de suministro en el que se administra.

Una “cantidad sub-terapéutica” puede ser una cantidad menor que la cantidad efectiva para ese agente. Cuando se combina con una cantidad efectiva o sub-terapéutica de uno o más agentes adicionales, la cantidad sub-terapéutica puede producir un resultado deseado por el médico, debido, por ejemplo, a la sinergia en los efectos eficaces resultantes o efectos adversos reducidos.

Como se usa en la presente descripción, los términos “tratamiento” o “tratar” se usan indistintamente en la presente. Estos términos se refieren a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados que incluyen, entre otros, un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o mejora del trastorno subyacente que se trata. Además, un beneficio terapéutico se logra con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con el trastorno subyacente de manera que se observa una mejora en el paciente, a pesar de que el paciente pueda aún estar aquejado con el trastorno subyacente. Un efecto profiláctico incluye retrasar o eliminar la aparición de una enfermedad o afección, retrasar o eliminar la aparición de los síntomas de una enfermedad o afección, retardar, detener o revertir la progresión de una enfermedad o afección, o cualquier combinación de las mismas. Para el beneficio profiláctico, las composiciones pueden administrarse a un paciente en riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un paciente que reporta uno o más de los síntomas psicológicos de una enfermedad, inclusive cuando no se ha hecho un diagnóstico de esta enfermedad.

El término "coadministración," "administrado en combinación con," y sus equivalentes gramaticales, como se usan en la presente descripción, incluye la administración de dos o más agentes a un animal de manera que ambos agentes y/o sus metabolitos están presentes al mismo tiempo en el animal. La co-administración incluye la administración simultánea en composiciones separadas, la administración en tiempos diferentes en composiciones separadas, o la administración en una composición en la cual ambos agentes están presentes.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales derivadas de una variedad de contraiones orgánicos e inorgánicos bien conocidos en la técnica e incluye, solo a modo de ejemplo, las sales de adición básica y sales de adición ácida. Las sales de adición básica pueden formarse en casos en donde el compuesto comprende una entidad ácida. Las sales de adición básica pueden formarse en casos en donde el compuesto comprende una entidad básica. Las sales de adición básica ejemplares incluyen las sales de metales alcalinos tales como, por ejemplo, sales de sodio, potasio y litio, las sales de metales alcalinotérreos tales como, por ejemplo, sales de calcio y magnesio, las sales de amonio tales como sales de amonio y tetraalquilamonio, las sales con bases orgánicas tales como trietilamina, morfolina, piperidina y dicitlohexilamina; y las sales con aminoácidos básicos como arginina y lisina. Las sales de adición ácida ejemplares pueden incluir las sales de ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como clorhidrato, bromhidrato, sulfato, nitrato, formato, acetato, benzoato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, citrato, oxalato, metanosulfonato, toluenosulfonato, aspartato, glutamato y similares. En un compuesto con más de una entidad básica, más de una de las entidades básicas puede convertirse en la forma de sal, que incluye, pero no se limita a una sal bis o tris. Alternativamente, un compuesto que tiene más de una entidad básica puede formar una sal en solo una de las entidades básicas. Se incluyen además dentro del alcance de esta invención las sales de los compuestos parentales con uno o más aminoácidos. Cualquiera de los aminoácidos descritos anteriormente es adecuado, especialmente los aminoácidos de origen natural que se encuentran como componentes de las proteínas, aunque el aminoácido es típicamente uno que porta una cadena lateral con un grupo básico o ácido, por ejemplo, lisina, arginina o ácido glutámico, o un grupo neutro, tales como glicina, serina, treonina, alanina, isoleucina o leucina.

Como se usa en la presente descripción, el término "halógeno" o "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo, o yodo.

Los términos "señalización", "ruta de señalización", "actividad de la ruta" y "actividad de la ruta de señalización" se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a un proceso durante el cual las señales se transmiten en, fuera y/o dentro de una célula para inducir una respuesta intracelular. El término "señalización del sustrato de SPOP" se refiere generalmente a una o más rutas de señalización mediadas por un sustrato de SPOP. Los sustratos de SPOP ejemplares y las rutas de señalización de los sustratos de SPOP se describen en la presente descripción. El término "señalización del sustrato de SPOP" abarca las interacciones proteína/proteína, proteína/glicoproteína, proteína/ácido nucleico y/o ácido nucleico/ácido nucleico mediadas por un sustrato de SPOP y/o una o más moléculas posteriores mapeadas a una ruta del sustrato de SPOP. Los ejemplos no limitantes de tales moléculas corriente abajo se describen en la presente.

Los términos "determinar", "medir", "evaluar", "estimar", "ensayar", y "analizar" se utilizan indistintamente en la presente invención para referirse a cualquier forma de medición, e incluyen determinar si un elemento está presente o no. Estos términos incluyen determinaciones cuantitativas y/o cualitativas. La evaluación puede ser relativa o absoluta. "Evaluar la presencia de" incluye determinar la cantidad presente de algo, así como determinar si está presente o ausente.

#### Información general

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones. Cualquiera de las referencias en la descripción con respecto a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

Los métodos, composiciones y estuches de la invención se relacionan con el descubrimiento de que lestaurtinib puede reducir los niveles de expresión y/o la actividad de la ruta de un sustrato de SPOP o la de su objetivo corriente abajo. Por consiguiente, en la presente se describen los métodos para regular negativamente la señalización del sustrato de SPOP en un sujeto que lo necesita. Los niveles aberrantemente altos y/o la actividad de la ruta de ciertos sustratos de SPOP se han relacionado con varias enfermedades, por ejemplo, ciertos tipos de cáncer. Por ejemplo, niveles aberrantemente altos y/o la actividad de la ruta de ciertos sustratos de SPOP se asocian con tumores, por ejemplo, cáncer de próstata, mama o gástrico. Por consiguiente, en la presente se describen una serie de métodos y composiciones para el uso del lestaurtinib en el tratamiento de tumores de próstata, de mama o gástricos en sujetos que comprenden niveles aberrantemente altos de uno o más sustratos de SPOP o sus actividades de la ruta de señalización. Cualquiera de los métodos puede comprender administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En la presente descripción se describe además un método para regular negativamente uno o más sustratos de SPOP o sus actividades de la ruta de señalización en una célula de próstata, mamaria o gástrica. El método puede comprender (a) administrar a la célula una cantidad eficaz de lestaurtinib o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, regulando de ese modo negativamente uno o más sustratos de SPOP o sus actividades de la ruta de señalización en la célula tumoral, tales como cáncer de próstata, mama o gástrico, y b) evaluar la regulación negativa de uno o más sustratos de SPOP o sus actividades de la ruta de señalización en la célula tumoral, tales como cáncer de próstata, mama o gástrico. Los métodos, composiciones y estuches de la invención se relacionan además con el

hallazgo de que la regulación negativa mediada por lestaurtinib, de un sustrato de SPOP y la actividad de la ruta del sustrato de SPOP se correlaciona con la capacidad del lestaurtinib para reducir la viabilidad de las células tumorales.

Por consiguiente, se describe adicionalmente en la presente descripción un método para tratar un tumor en un sujeto que lo necesita. El método puede comprender (a) administrar al sujeto una primera dosis de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo; (b) determinar un nivel de sustrato de SPOP o su actividad en una muestra biológica derivada del sujeto; y (c) administrar una dosis adicional de la composición farmacéutica si el nivel de sustrato o su actividad se reduce en comparación con un sujeto control al que no se administra una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Se proporcionan además los estuches para practicar cualquiera de los métodos de la invención.

Sustratos de SPOP ejemplares y rutas de señalización del sustrato de SPOP

Al practicar cualquiera de los métodos de la invención, el sustrato de SPOP que se regula negativamente puede ser cualquier proteína capaz de formar un complejo con SPOP. En algunas modalidades, el sustrato de SPOP que se regula negativamente es una proteína que es capaz de formar un complejo con SPOP de tipo silvestre. La formación de un complejo con SPOP (por ejemplo, con SPOP de tipo silvestre) puede evidenciarse mediante la unión del sustrato con SPOP. La unión puede ser una unión débil o fuerte. La unión puede implicar la unión transitoria o permanente. En algunas modalidades, el sustrato de SPOP es capaz de formar un complejo con SPOP a través de uno o más aminoácidos en un dominio MATH de la proteína SPOP. El dominio MATH puede comprender los aminoácidos 31-161 de la secuencia de aminoácidos de SPOP. En algunas modalidades, el sustrato de SPOP es capaz de formar un complejo con uno o más aminoácidos entre y que incluyen los aminoácidos de las posiciones 31-161 en la secuencia de la proteína SPOP. En algunas modalidades, el sustrato de SPOP es capaz de formar un complejo con uno o más aminoácidos entre y que incluyen los aminoácidos de las posiciones 60-140 en la secuencia de la proteína SPOP. En algunas modalidades, el sustrato de SPOP es capaz de formar un complejo con uno o más aminoácidos entre y que incluyen los aminoácidos de las posiciones 87-133 en la secuencia de la proteína SPOP. En algunas modalidades, el sustrato de SPOP es capaz de formar un complejo con un fragmento de proteína SPOP. El fragmento puede comprender una porción o la totalidad de un dominio MATH de la secuencia de aminoácidos de SPOP. Por ejemplo, el fragmento puede comprender los aminoácidos 31-161, 60-140, u 87-133 de la secuencia de la proteína SPOP.

Los sustratos de SPOP que pueden formar un complejo con SPOP pueden incluir las proteínas que comprenden una secuencia de unión consenso de SPOP (SPOP-CBS). El SPOP-CBS puede comprender la secuencia SS/T-S/T. El SPOP-CBS puede comprender la secuencia  $\pi$ -S-S/T-S/T o  $\varphi$ - $\pi$ -S-S/T-S/T, en donde  $\varphi$  es un aminoácido no polar y  $\pi$  es un aminoácido polar. Los aminoácidos no polares ejemplares incluyen, pero necesariamente no se limitan a A, C, G, I, L, M, F, P, W, Y y Z. Los aminoácidos polares ejemplares incluyen, pero necesariamente no se limitan a R, N, D, Q, Z y K. El SPOP-CBS puede comprender la secuencia S-S/T-S/T precedida por un aminoácido ácido (por ejemplo, D o Z). Por ejemplo, el SPOP-CBS puede comprender la secuencia D/E-X<sub>i</sub>-S-S/T-S/T, en donde X es cualquier aminoácido e  $i=0-2$ . En algunas modalidades,  $i=0$ . En algunas modalidades,  $i=1$ . En algunas modalidades,  $i=2$ . En algunas modalidades, el SPOP-CBS es DSTT, DVSST, EVTSTT o DSTSS. Los polipéptidos que comprenden un SPOP-CBS pueden identificarse buscando en la base de datos de proteínas para polipéptidos que contienen la secuencia SPOP-CBS. Por ejemplo, una secuencia SPOP-CBS puede usarse para consultar las secuencias de proteínas utilizando el algoritmo BLAST de proteínas. Los ejemplos de sustratos de SPOP que comprenden un SPOP-CBS incluyen, solo a modo de ejemplo, AWP1, enlazador para la activación del miembro 1 de la familia de células T, cullin 4B y cullin 7.

La capacidad de un sustrato de SPOP para formar un complejo con SPOP o fragmento del mismo puede determinarse por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un experto en la técnica tiene a su disposición numerosos métodos para evaluar las interacciones proteína-proteína. En algunas modalidades, la formación del complejo se detecta mediante un ensayo de unión. El ensayo de unión puede usarse para detectar la unión entre SPOP y una proteína que se sospecha que es un sustrato de SPOP. Los ensayos de unión ejemplares incluyen, pero no se limitan a, coimmunoprecipitación, ensayos pull-down, análisis de interacción de proteínas de entrecruzamiento, análisis de interacción de proteínas de transferencia marcadoras y análisis de transferencia de membranas tipo far-western. Otros ensayos para detectar las interacciones proteína-proteína incluyen, por ejemplo, los ensayos doble híbridos de levadura y ensayos de resonancia de plasmón superficial.

Los ensayos de coimmunoprecipitación típicamente implican el uso de un anticuerpo de captura para capturar una proteína objetivo y cualquier otra proteína en complejo con la proteína objetivo. Las proteínas que forman un complejo con el objetivo pueden ensayarse después por cualquier medio conocido en la técnica, tales como, por ejemplo, la tinción con Coomassie, la detección de anticuerpos y/o la detección de marcadores. Solo a modo de ejemplo, una muestra de proteína que comprende un supuesto sustrato de SPOP puede incubarse con un anticuerpo de SPOP inmovilizado en un soporte sólido o semisólido, por ejemplo, una perla. Cualquiera de los complejos que comprenden la SPOP (o fragmento de SPOP) y una pareja de unión a SPOP (por ejemplo, un sustrato de SPOP) puede ser capturado por el anticuerpo SPOP inmovilizado. Los complejos pueden analizarse después, por cualquier medio conocido en la técnica para identificar a la pareja de unión de SPOP.

Los ensayos pull-down suelen usar una proteína cebo capturada en una superficie sólida o semisólida. La proteína cebo inmovilizada puede incubarse con una muestra de proteína que comprende proteínas potenciales “presas”. Las proteínas “presas” pueden formar un complejo con la proteína cebo inmovilizada. Las proteínas “presas” capturadas pueden eluirse y evaluarse por cualquier medio conocido en la técnica.

5 La reticulación química puede usarse para “fijar” las interacciones de proteínas en el lugar previo al aislamiento o la identificación de las parejas de unión. Los agentes de reticulación comunes para esta aplicación incluyen el agente de reticulación NHS-éster no escindible, suberato de bissulfosuccinimidilo (BS3); una versión escindible de BS3, ditiobis(sulfosuccinimidil propionato) (DTSSP); y el agente de reticulación imidoéster dimetil ditiobispropionimidato (DTBP) que es popular para la fijación de interacciones en los ensayos ChIP. Después de la reticulación, pueden detectarse y/o identificarse las parejas de unión a proteína por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una pareja de unión puede identificarse por espectrometría de masas, por ejemplo, espectrometría de masas MALDI de alta masa.

15 La transferencia de marcadores puede utilizarse para seleccionar o confirmar las interacciones de proteínas y puede proporcionar información sobre la interfaz donde se produce la interacción. En una reacción típica de transferencia de marcadores, una proteína cebo se une a un marcador detectable. Esta proteína cebo marcada puede después permitir que se forme un complejo con una proteína presa. Después de la formación del complejo, el enlace al marcador detectable se transfiere de la proteína de cebo a la proteína presa. La interacción proteína-proteína puede analizarse después mediante múltiples métodos, que incluyen el análisis de transferencia de membrana tipo Western, el análisis de secuencia de proteínas y la espectrometría de masas.

25 En un análisis de tipo far-western, una proteína “cebo” marcada o detectable por un anticuerpo se utiliza generalmente para sondear y detectar una proteína “presa” en la membrana. Las proteínas en una muestra que contiene la proteína presa se separan mediante electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-PAGE) o PAGE nativa y se inmovilizan después sobre un soporte sólido o semisólido. Después de la transferencia, el soporte sólido o semisólido se prueba con una proteína de cebo marcada. Se deja que la proteína cebo forme un complejo con una pareja de unión inmovilizada. Un sistema de detección, dependiente del marcador utilizado, identifica la banda que corresponde a la pareja de unión.

30 Un ensayo doble híbrido de levadura se basa en el descubrimiento de que un factor de transcripción para activar la expresión de, por ejemplo, un gen reportero, puede dividirse en dos componentes modulares. Los componentes modulares pueden incluir un componente de unión a ADN y un componente activador de la transcripción. En un ensayo doble híbrido de levadura, una cepa de levadura se transfecta con plásmidos de “cebo” y “presa”. El plásmido cebo codifica generalmente una proteína “cebo” fusionada con uno de los dos componentes modulares (por ejemplo, el componente de unión al ADN), mientras que el plásmido “presa” codifica generalmente una pareja de unión sospechosa de la proteína “cebo” fusionada con la otra los dos componentes modulares (por ejemplo, el componente activador de la transcripción). La formación de un complejo que comprende la proteína “cebo” y la pareja de unión trae generalmente los dos componentes del factor de transcripción en una proximidad suficiente para efectuar la transcripción del gen reportero. La detección de la transcripción del gen reportero activado puede indicar la formación de un complejo entre la proteína cebo y la pareja de unión. En algunas modalidades, la proteína cebo es SPOP o el fragmento de SPOP y la pareja de unión es un supuesto sustrato SPOP. En algunas modalidades, la proteína cebo es un supuesto sustrato de SPOP y la pareja de unión es SPOP o el fragmento de SPOP.

45 La Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) puede usarse además para detectar las parejas de unión a SPOP. La SPR típicamente utiliza una proteína de cebo inmovilizada en un cristal de SPR. Una solución líquida que comprende proteínas “presas” se inyecta sobre la capa de cebo. La formación de un complejo entre el cebo y la presa se evidencia por un aumento en la señal de SPR (expresada en unidades de respuesta, RU).

50 En algunas modalidades, el sustrato de SPOP que se regula negativamente es una proteína capaz de ubiquitinarse por un complejo SPOP/ubiquitina ligasa. La capacidad de un sustrato de SPOP para ubiquitinarse por el complejo SPOP/ubiquitina ligasa puede determinarse in vivo o in vitro mediante los métodos descritos en la presente descripción o de cualquier otro modo conocido en la técnica. Por ejemplo, la ubiquitinación de un sustrato de SPOP por un complejo SPOP/ubiquitina ligasa puede determinarse in vitro. Un ejemplo de ensayo de ubiquitinación in vitro comprende combinar en la solución (1) el supuesto sustrato de SPOP, (2) ubiquitina, (3) SPOP/ubiquitina ligasa, y (4) cualquiera de los componentes de la reacción requerido para la ubiquitinación. La solución puede incubarse durante un tiempo suficiente para que se produzca la ubiquitinación de un sustrato de SPOP.

60 La ubiquitinación de un sustrato de SPOP por un complejo SPOP/ubiquitina ligasa puede determinarse in vivo. Solo a modo de ejemplo, las células cultivadas pueden transfectarse con la ubiquitina marcada, el supuesto sustrato de SPOP y/o SPOP. Las células pueden tratarse con un inhibidor proteosómico para permitir la acumulación de las proteínas ubiquitinadas. Las proteínas ubiquitinadas que comprenden la ubiquitina marcada pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido o semisólido, y detectarse y/o identificarse por cualquier medio conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, el inmunoensayo.

65

- Los sustratos de SPOP pueden incluir proteínas que se degradan por un complejo SPOP/ubiquitina ligasa. La degradación mediada por SPOP de un sustrato de SPOP puede determinarse in vivo o in vitro. La degradación mediada por SPOP de un sustrato de SPOP puede determinarse in vivo, por ejemplo, incubando las células que expresan un sustrato de SPOP en presencia o ausencia de SPOP, y comparar los niveles de sustrato de SPOP en las células cultivadas en presencia de SPOP con los niveles del sustrato de SPOP en las células cultivadas en ausencia de SPOP. Una reducción en el nivel de sustrato de SPOP en las células cultivadas en presencia de SPOP en comparación con los niveles de sustrato de SPOP en las células cultivadas en ausencia de SPOP puede ser indicativa de la degradación mediada por SPOP del sustrato de SPOP.
- En algunas modalidades, la actividad de la ruta del sustrato de SPOP que se regula negativamente es una ruta de señalización de andrógenos en el sujeto. En algunos casos, el sustrato de SPOP que se regula negativamente mejora la actividad de una ruta de señalización de andrógenos. La señalización de andrógenos generalmente está mediada por el receptor de andrógenos. La unión de un ligando de la hormona andrógena a AR generalmente induce la translocación nuclear de la AR. La AR puede reclutar después las proteínas correguladoras que pueden modular la regulación transcripcional mediada por AR de los genes objetivo. Por ejemplo, la AR activada puede unirse a un elemento de respuesta AR y activar la transcripción de un gen objetivo de AR. Los genes objetivos de AR ejemplares incluyen, pero no se limitan a TMPRSS2, IGF1-R, NKXX3.1, CXCR4, MAK, MAF, N4A1, GREB1 y FKBP5. Dichos genes objetivo de AR representan ejemplos no limitativos de moléculas corriente abajo representadas en una ruta de sustrato de SPOP.
- En algunas modalidades, el sustrato de SPOP que mejora la señalización del receptor de andrógenos es una proteína correguladora AR, que mejora además la señalización del Receptor de Estrógeno (ER). Las proteínas correguladoras de AR y ER ejemplares que son sustratos de SPOP incluyen las proteínas de la familia de coactivadores p160. Las proteínas coactivadoras P160 pueden incluir SRC1, SRC2 (TIF2) y SRC3 (también conocido como AIB<sub>1</sub>). Estas proteínas coactivadoras p160 pueden activar la activación transcripcional mediada por AR/ER de los genes objetivo AR/ER. En particular, la SRC3 puede activar significativamente la transcripción mediada por AR/ER de los genes objetivo, y puede ubiquitinarse por un complejo de ubiquitina ligasa SPOP/E3. Por consiguiente, en algunas modalidades, el método implica regular negativamente la ruta de señalización de la proteína coactivadora p160 en un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, la proteína coactivadora p160 es la SRC3. Sin deseos de estar limitado por la teoría, es posible que la actividad reducida de SPOP pueda resultar en una ubiquitinación reducida de la SRC3, lo que de ese modo aumenta los niveles de proteína SRC3 y posteriormente aumenta la expresión génica específica de AR. Por consiguiente, en algunas modalidades, un método de la invención comprende regular negativamente el nivel de SRC3 o su actividad de señalización en un sujeto que lo necesita.
- Los sustratos de SPOP que afectan la señalización de andrógenos pueden incluir además, por ejemplo, la proteína 6 de dedo de zinc tipo AN1 (AWP1). La AWP1 generalmente se refiere a una proteína de dedo de zinc que interactúa con el factor 2 asociado con el receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF2) (Int J Biochem Cell Biol 2011; 43: 1612-1620). La reducción del nivel de proteína AWP1 puede aumentar la muerte celular inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (Int J Biochem Cell Biol 2011; 43: 1612-1620). Por el contrario, el aumento de la proteína AWP1 puede inhibir la muerte celular, lo que mejora de ese modo la formación de tumores. La AWP1 interactúa además con la PRK1, una serina/reonina quinasa de la familia de la proteína quinasa C (Gene 2000; 256: 113-121). La estimulación de la PRK1 puede causar la superactivación dependiente de ligando de AR (EMBO J 2003; 22: 270-280). Sin deseos de estar limitado por la teoría, es posible que la actividad reducida de SPOP pueda resultar en una ubiquitinación reducida de la AWP1, lo que de ese modo aumenta los niveles de proteína AWP1 y la actividad de AWP1. La actividad de la ruta de AWP1 puede reducir la muerte celular de, por ejemplo, las células tumorales de la próstata. Además, la actividad de la ruta de AWP1 puede mejorar la señalización de PRK1 y, posteriormente, inducir la superactivación de AR. Por consiguiente, en algunas modalidades, un método de la invención comprende regular negativamente el nivel de AWP1 o la señalización de AWP1 en un sujeto que lo necesita.
- Los sustratos de SPOP que afectan la señalización de andrógenos pueden incluir además, las proteínas Gli. Las proteínas Gli generalmente se refieren a una clase de factores de transcripción de proteínas que median la ruta de señalización hedgehog. Las proteínas Gli pueden incluir Gli1, Gli2 y Gli3. En particular, la Gli1 puede actuar en los seres humanos como una oncoproteína. La actividad de la ruta de Gli puede mejorar la expresión génica específica de AR y puede permitir que las células LNCaP sensibles a los andrógenos crezcan en un medio empobrecido de andrógenos. Sin deseos de estar limitado por la teoría, es posible que la actividad reducida de SPOP pueda resultar en una ubiquitinación reducida de Gli, lo que de ese modo aumenta los niveles de proteína Gli y posteriormente aumenta la expresión génica específica de AR. Por consiguiente, en algunas modalidades, el método implica regular negativamente la señalización de sustrato de Gli en un sujeto que lo necesita. En modalidades particulares, la ruta de señalización del sustrato de Gli es una ruta de señalización del sustrato de Gli1.
- Los sustratos de SPOP pueden incluir DEK; su secuencia de proteínas tiene la presencia de un motivo de consenso DSSTT y DESSS, lo que sugiere que la DEK posiblemente podría degradarse mediante la ruta mediada por SPOP, y los niveles aumentan si SPOP tiene mutaciones de pérdida de función o pérdida de expresión de proteínas por otras razones. Tanto en las células de cáncer de próstata como en las de cáncer gástrico, los niveles de expresión de DEK parecieron ser más altos que los de SRC3, mientras que en el cáncer de mama, el nivel de expresión de DEK fue menor, pero mostró una disminución después de que las células de cáncer de mama se trataron con lestaurtinib, que es similar a la SRC3.

En algunas modalidades, el sustrato de SPOP o la actividad de la ruta del sustrato que se regula negativamente afecta a la proliferación celular, la supervivencia y/o la apoptosis. Por ejemplo, un sustrato de SPOP puede reprimir la apoptosis en una célula. La regulación negativa de la actividad de señalización de tales sustratos de SPOP puede posiblemente mejorar la apoptosis de una célula tumoral, por ejemplo, una célula tumoral de próstata. Los sustratos de SPOP ejemplares que reprimen la apoptosis celular incluyen, entre otros, AWP1 y Daxx. La actividad de la ruta de Daxx puede reprimir la muerte celular. Por ejemplo, la actividad de la ruta de Daxx puede inhibir la muerte celular al inhibir la actividad del supresor tumoral p53. Sin deseos de estar limitado por la teoría, es posible que la actividad reducida de SPOP pueda resultar en una ubiquitinación reducida de Daxx, lo que de ese modo aumenta los niveles de proteína Daxx y posteriormente se reprime la muerte celular de, por ejemplo, una célula tumoral. Por consiguiente, en algunas modalidades, el método implica regular negativamente la señalización del sustrato Daxx en un sujeto que lo necesita.

#### Regulación negativa del nivel o actividad del sustrato de SPOP

Al practicar cualquiera de los métodos de la invención, la administración de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib a un sujeto que lo necesita puede resultar en una regulación negativa de un nivel de sustrato de SPOP y/o actividad de la ruta en el sujeto. Del mismo modo, la administración de una cantidad efectiva de lestaurtinib a una célula tumoral puede resultar en un nivel de sustrato de SPOP y/o actividad de la ruta en la célula tumoral. Los sustratos de SPOP ejemplares, y las actividades de la ruta de los mismos, se describen en la presente descripción. La regulación negativa de los niveles de sustrato de SPOP y/o las actividades de la ruta de los mismos puede determinarse mediante una variedad de métodos descritos en la presente descripción o de cualquier otro modo conocido en la técnica. Por ejemplo, la regulación negativa de los niveles de sustrato de SPOP y/o sus actividades de ruta en un sujeto puede determinarse mediante la comparación con un sujeto de control y/o una población de control. El sustrato de SPOP y/o su señalización pueden considerarse regulados negativamente en el sujeto si el nivel del sustrato o la señalización en el sujeto se reduce en comparación con un sujeto de control y/o una población de control. El sujeto de control puede ser un sujeto al que no se le haya administrado lestaurtinib. Del mismo modo, una población de control puede abarcar una pluralidad de individuos a los que no se les ha administrado lestaurtinib. El sujeto de control puede ser un sujeto que necesita una regulación negativa del sustrato de SPOP o una regulación negativa de la actividad del sustrato de SPOP, al que no se le administra lestaurtinib. El sustrato de SPOP o la actividad de la ruta del mismo puede reducirse en comparación con un sujeto de control que lo necesita, pero no se le administró lestaurtinib.

El sujeto de control no tiene que ser un sujeto diferente de dicho sujeto, pero puede ser el mismo sujeto en un intervalo de tiempo anterior, por ejemplo, el mismo sujeto antes de recibir una primera dosis de lestaurtinib. Por consiguiente, la regulación negativa de un sustrato de SPOP o su señalización en el sujeto después de la primera administración de lestaurtinib puede compararse con un nivel de sustrato de SPOP o actividad de la ruta del mismo en el propio sujeto antes de la primera administración de lestaurtinib. Por ejemplo, un método para evaluar la regulación negativa de SPOP en un sujeto que lo necesita puede comprender medir un nivel de sustrato de SPOP o la actividad de la ruta en el sujeto o en una muestra biológica derivada del sujeto en un primer intervalo de tiempo. El sujeto puede tener, ser sospechoso de tener, o ser sospechoso de estar en un riesgo mayor cualquiera de las enfermedades descritas en la presente. El sujeto puede, por ejemplo, tener un tumor de próstata, mamario o gástrico. El primer intervalo de tiempo puede ser un intervalo de tiempo antes de la administración de una composición como se describe en la presente. El método puede comprender además medir el nivel de sustrato de SPOP o la actividad de la ruta en el sujeto o en una muestra biológica derivada del sujeto en un segundo intervalo de tiempo. El segundo intervalo de tiempo puede seguir a la administración de la composición. El nivel medido en el segundo intervalo de tiempo puede compararse con el nivel medido en el primer intervalo de tiempo para determinar si se ha producido una regulación negativa. En algunas modalidades, la regulación negativa indica la eficacia clínica de la administración de la composición farmacéutica. En algunas modalidades, el método comprende además administrar una dosis adicional de la composición farmacéutica si se reduce el nivel del sustrato de SPOP o su actividad de la ruta.

El nivel de sustrato de SPOP o su señalización puede determinarse en el sujeto o en una muestra biológica derivada del sujeto. La muestra biológica puede ser una muestra fluida. Las muestras de fluidos ejemplares incluyen, por ejemplo, muestra de sangre completa, plasma, suero, ascitis, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, lágrimas, saliva o bucal. La muestra biológica puede ser también una muestra biológica sólida. Las muestras biológicas sólidas ejemplares incluyen, por ejemplo, heces o una biopsia de tejido. La muestra biológica puede albergar o se sospecha que alberga células enfermas o tejido enfermo. Las células o tejidos enfermos pueden ser células tumorales o tejido tumoral. Las células o tejidos tumorales pueden ser las células o tejidos cancerosos. Las células pueden ser, por ejemplo, células madre cancerosas o células tumorales circulantes. La muestra biológica puede albergar o se sospecha que alberga macromoléculas derivadas de las células o tejidos enfermos. La muestra biológica puede ser una muestra esencialmente libre de células que alberga o se sospecha que alberga macromoléculas derivadas de las células o tejidos enfermos. Las macromoléculas pueden ser polipéptidos y/o polinucleótidos. Los polinucleótidos pueden ser, por ejemplo, ARN o ADN.

Un nivel de sustrato de SPOP puede referirse a un nivel de expresión del sustrato de SPOP. Un nivel de expresión del sustrato de SPOP puede referirse a un nivel de proteína y/o concentración del sustrato de SPOP en un sujeto o

muestra biológica. Los niveles y/o la concentración de proteínas pueden determinarse por cualquier medio conocido en la técnica. Los métodos ejemplares incluyen, pero no se limitan a Western blot, ELISA, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, espectrometría de masas, imágenes, por ejemplo, imágenes de PET, inmunofluorescencia, microarreglos de proteínas e inmunohistoquímica.

5 Un nivel de sustrato de SPOP puede referirse a un nivel y/o concentración de polinucleótido que codifica la proteína del sustrato de SPOP. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, ADN y/o ARN. Los métodos para evaluar los niveles y/o la concentración de polinucleótidos son conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos ejemplares incluyen, pero no se limitan a la secuenciación, secuenciación de próxima generación, microarreglos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real (RT-PCR), PCR digital, hibridación in situ (ISH), ensayo de protección de la ARNasa y similares.

15 Un nivel de sustrato de SPOP puede evidenciarse por un nivel en el que un sustrato de SPOP se dirige a la degradación mediante, por ejemplo, la ruta de degradación de ubiquitina-proteosoma. Una demostración de este tipo puede incluir, pero no se limita a, la evidencia de ubiquitinación de sustrato de SPOP. Se describen en la presente, los métodos ejemplares para evaluar la ubiquitinación de sustratos de SPOP. Por ejemplo, la ubiquitinación mejorada de un sustrato de SPOP puede indicar una regulación negativa mejorada del sustrato de SPOP. El nivel de sustrato de SPOP puede evidenciarse evaluando la degradación mediada por SPOP del sustrato de SPOP. Se describen en la presente, los métodos ejemplares para evaluar la degradación mediada por SPOP del sustrato de SPOP.

20 El nivel de señalización de sustrato de SPOP en un sujeto o muestra biológica derivada del sujeto puede determinarse por cualquier método conocido por los expertos en la técnica y/o por los métodos descritos en la presente descripción. Las rutas de señalización de SPOP ejemplares se describen en la presente descripción e incluyen, por ejemplo, la señalización del receptor de andrógenos, la actividad de PRK1 y la inhibición de la muerte celular. La señalización del receptor de andrógenos puede determinarse de varias maneras. Por ejemplo, la señalización del receptor de andrógenos puede determinarse midiendo el nivel y/o la concentración de los transcritos activados por el receptor de andrógenos. El nivel y/o la concentración de los transcritos (por ejemplo, los transcritos de ARNm) pueden determinarse mediante los métodos descritos en la presente, por ejemplo, RT-PCR, ensayo de protección de ARNasa, hibridación in situ y similares. Los genes objetivo activados por el receptor de andrógenos incluyen, pero no se limitan a TMPRSS2, IGF1-R, NKX3.1, CXCR4, MAK, MAF, N4A1, GREB1 y FKBP5. A modo de otro ejemplo, la señalización del receptor de andrógenos puede determinarse mediante un ensayo de reportero de receptores de andrógenos. En un ensayo ejemplar de reportero del receptor de andrógenos, las células se transfectan con un plásmido que expresa un gen reportero bajo el control de un elemento de respuesta del receptor de andrógenos. La actividad del receptor de andrógenos puede inferirse por el nivel del reportero detectado en el ensayo. La señalización del receptor de andrógenos puede determinarse evaluando la sensibilidad del sujeto o la muestra biológica derivada del sujeto al andrógeno. La sensibilidad al andrógeno puede determinarse, por ejemplo, mediante una curva de dosis-respuesta, o midiendo la respuesta del sujeto o muestra biológica a cantidades conocidas de andrógeno.

40 La actividad de PRK1 puede determinarse mediante métodos descritos en la presente o de cualquier otra manera conocidos en la técnica. Por ejemplo, la actividad de PRK1 puede determinarse mediante la evaluación de la fosforilación de objetivos de PRK1 conocidos. Los objetivos de PRK1 conocidos incluyen, por ejemplo, la Histona H3. La PRK1 puede fosforilar la Histona H3 en su posición de Treonina 11 (H3T11). La fosforilación de H3T11 mediada por PRK1 puede resultar en una mejor señalización del receptor de andrógenos. La fosforilación de H3T11 puede determinarse, por ejemplo, mediante la transferencia de membrana de tipo Western y/o ensayo de quinasas.

45 Otra ruta de señalización ejemplar de la SPOP implica la inhibición mediada por AWP1 de la muerte celular inducida por TNF $\alpha$ . Una ruta de señalización de TNF $\alpha$  puede comprender la activación de NF- $\kappa$ B. La activación de NF- $\kappa$ B puede comprender el reclutamiento de las proteínas TRAF2 y RIP. La TRAF2, a su vez, puede reclutar la proteína quinasa IKK de componentes múltiples, lo que permite que la serina-treonina quinasa RIP la active. Una proteína inhibitoria, I $\kappa$ B $\alpha$ , que normalmente se une a NF- $\kappa$ B e inhibe su translocación, puede fosforilarse por IKK y posteriormente degradarse, liberando NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B generalmente se refiere a un factor de transcripción heterodimérico que se traslada al núcleo y media la transcripción de una amplia gama de proteínas involucradas en la supervivencia y proliferación celular, la respuesta inflamatoria y los factores antiapoptóticos. Una ruta de señalización de TNF $\alpha$  puede comprender la activación de las rutas MAPK. Por ejemplo, la señalización TNF $\alpha$  puede inducir la ruta JNK relacionada con el estrés, puede inducir la ruta p38-MAPK, y además puede inducir ERK. El TRAF2/Rac reclutado puede activar las quinasas corriente arriba inductoras de JNK de MLK2/MLK3, TAK1, MEKK1 y ASK1 (ya sea directamente o a través de GCK y Trx, respectivamente). El eje SRC- Vav- Rac puede activar MLK2/MLK3. Las quinasas MLK2/MLK3 pueden fosforilar MKK7, que después puede activar JNK. JNK puede translocarse al núcleo y activar factores de transcripción tales como c-Jun y ATF2. La ruta JNK puede ser una ruta proapoptótica. TNF $\alpha$  además puede inducir necrosis celular. La necrosis celular puede ser una muerte celular independiente de la caspasa. La necrosis inducida por TNF $\alpha$  puede asociarse con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS pueden evaluarse por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, ROS puede evaluarse mediante una sonda reportera que fluoresce tras la oxidación. Las sondas ejemplares que fluorescen tras la oxidación incluyen 7'-diclorofluoresceína (DCF), carboxi-H2DCFDA, H2DFFDA, Dihidrocaldceína, AM, aminofenil fluoresceína, hidroxifenil fluoresceína y calceína, entre otras. Los estuches para evaluar ROS están disponibles en el comercio de, por ejemplo, Abcam, Cell Bio Labs, Life Technologies y Sigma-Aldrich. La necrosis además puede determinarse por análisis morfológico. Las

características morfológicas de la necrosis incluyen, pero sin limitarse a, la aglomeración densa y la disrupción progresiva del material genético, y el cambio de las membranas de células y orgánulos. Por ejemplo, la cromatina nuclear puede desvanecerse debido a la degradación del ADN. La necrosis puede evidenciarse por encogimiento del núcleo, por condensación de la cromatina y fragmentación nuclear. Las membranas plasmáticas pueden parecer discontinuas. Esta membrana discontinua puede causarse por la explosión de células y la pérdida de las microvellosidades. La muerte celular puede evaluarse por cualquier medio conocido en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, el recuento celular, el ensayo MTT, la tinción con TUNEL, la tinción con Anexina V, la tinción con anexina V/yoduro de propidio, y similares.

Un método ilustrativo de la invención puede comprender la administración de una cantidad eficaz de lestaurtinib a una célula tumoral, regulando de ese modo negativamente un nivel de sustrato de SPOP o su actividad en la célula. El método puede comprender además evaluar la regulación negativa de un nivel de sustrato de SPOP o su actividad en la célula tumoral. Los métodos para evaluar la regulación negativa se describen en la presente descripción. La célula tumoral puede comprender un nivel elevado o actividad de la ruta de un sustrato de SPOP. La célula tumoral puede ser una célula derivada de un sujeto como se describe en la presente descripción. La célula tumoral puede ser una célula tumoral de próstata, de mama, o gástrica. La célula tumoral puede ser una célula tumoral gástrica, de mama o de próstata sensible a andrógenos o estrógenos. La célula tumoral puede ser una célula cultivada. La célula cultivada puede ser, por ejemplo, una célula LNCaP, PC3 o MCF7. En algunas modalidades, la cantidad eficaz es 0,01 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 90 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 300 nM, 350 nM, 400 nM, 450 nM, 500 nM, 550 nM, 600 nM, 650 nM, 700 nM, 750 nM, 800 nM, 850 nM, 900 nM, 950 nM, 1000 nM, 1100 nM, 1200 nM, 1300 nM, 1400 nM, 1500 nM, 1600 nM, 1700 nM, 1800 nM, 1900 nM, 2000 nM, 2100 nM, 2200 nM, 2300 nM, 2400 nM, 2500 nM, 2600 nM, 2700 nM, 2800 nM, 2900 nM, 3000 nM, 3100 nM, 3200 nM, 3300 nM, 3400 nM, 3500 nM, 3600 nM, 3700 nM, 3800 nM, 3900 nM, 4000 nM, 5000 nM, 6000 nM, 7000 nM, 8000 nM, 9000 nM, 10000 nM (10 µM), 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 35 µM, 40 µM, 45 µM, 50 µM, 55 µM, 60 µM, 65 µM, 70 µM, 75 µM, 80 µM, 85 µM, 90 µM, 95 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM, 400 µM, 500 µM, 600 µM, 700 µM, 800 µM, 900 µM, o 1000 µM (1 mM). En algunas modalidades, la cantidad eficaz es 0,01-10 nM, 10 nM-100 nM, 30 nM-1000 nM, 100 nM-3000 nM, 500 nM-10,000 nM (10 µM), 1-100 µM, o 50 µM -1000 µM (1 mM).

La administración de una cantidad eficaz de lestaurtinib o la administración de una composición farmacéutica que comprende lestaurtinib puede regular negativamente un nivel de sustrato de SPOP o su actividad de la ruta en al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40 %, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más que 99%. La administración de una composición farmacéutica descrita en la presente descripción puede regular negativamente el nivel de sustrato de SPOP o su actividad de la ruta en un 5-20%, 10-40%, 30-60%, 40-80%, 60-95%, o 75-99%.

La regulación negativa de un nivel de sustrato de SPOP o su actividad de la ruta mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende lestaurtinib puede tener un beneficio terapéutico para el sujeto. Por ejemplo, en los casos en donde el sujeto padece un tumor o cáncer (por ejemplo, un tumor de próstata o cáncer), la regulación negativa de un nivel de sustrato de SPOP o su actividad de la ruta en el sujeto puede reducir la viabilidad de un tumor de próstata o célula cancerosa en el sujeto. La regulación negativa de un nivel de sustrato de SPOP o su actividad de la ruta puede retrasar o detener la progresión del crecimiento de células tumorales o cancerosas en el sujeto, puede reducir el número de células cancerosas en el sujeto, puede reducir un tumor o cáncer en el sujeto, puede prevenir o retrasar la metástasis de un tumor o cáncer en el sujeto, o puede prevenir profilácticamente la formación de un tumor o cáncer en el sujeto. En sujetos con cáncer de próstata, la regulación negativa de un nivel de sustrato de SPOP o su actividad puede reducir los niveles de PSA en sangre en el sujeto.

La regulación negativa de un nivel de sustrato de SPOP o su actividad en un sujeto puede usar como un indicador de la eficacia terapéutica de lestaurtinib en el sujeto. Por lo tanto, un método de la invención puede comprender (a) administrar al sujeto una primera dosis de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o una de las sales farmacéuticamente aceptables de este; (b) determinar un nivel de sustrato de SPOP o su actividad en una muestra biológica derivada del sujeto; y (c) administrar una dosis adicional de la composición farmacéutica si el nivel de sustrato o su actividad se reduce en comparación con un sujeto de control que no se le administra una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Sujetos ejemplares

Al practicar cualquiera de los métodos de la invención, el sujeto puede ser cualquier sujeto que necesita una regulación negativa de un nivel de sustrato de SPOP o su actividad de la ruta. Los sujetos ejemplares se describen en la presente descripción.

El sujeto que necesita una regulación negativa de un nivel de sustrato de SPOP o su actividad de la ruta puede albergar una célula o tejido que comprende un nivel elevado o actividad de la ruta de un sustrato de SPOP. El sujeto que necesita una regulación negativa de un nivel de sustrato de SPOP o su actividad de la ruta puede albergar una célula o tejido que comprende un nivel elevado o actividad de la ruta de un sustrato de SPOP. La célula o tejido del sujeto que comprende un nivel elevado o actividad de la ruta de un sustrato de SPOP pueden ser un tejido o célula enferma,

tal como, por ejemplo, un tumor o tejido o célula cancerosa. En algunas modalidades, la célula o tejido enfermo comprende un nivel elevado o actividad de la ruta de un sustrato de SPOP, en comparación con un tejido o célula no enfermo.

5 El sustrato de SPOP y/o la actividad de la ruta de esta que se eleva puede tener cualquiera de los sustratos o señalización de la SPOP descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, el sustrato de SPOP y/o la actividad de la ruta que se eleva es un activador de esteroides p160, tales como SRC1, SRC2, o SRC3. En algunas modalidades, el sustrato de SPOP y/o la actividad de la ruta de esta que se eleva es SRC3. El sustrato de SPOP o la actividad de la ruta de esta que se eleva puede ser AWP1. El sustrato de SPOP o la actividad de la ruta de esta que se eleva puede ser Gli. El sustrato de SPOP o la actividad de la ruta que se eleva pueden ser Gli-1, Gli-2, y/o Gli-3. Una ruta de señalización de sustrato de SPOP que se eleva puede resultar en un aumento de la señalización de PRK1 y/o la expresión de PRK1.

15 El nivel elevado o la actividad de la ruta del sustrato de SPOP pueden determinarse en el sujeto o en una muestra biológica derivada del sujeto. Muestras biológicas ejemplares se describen en la presente descripción.

20 En algunas modalidades, el nivel o la actividad de la ruta del sustrato de SPOP en el sujeto o muestra biológica derivada del sujeto se eleva en comparación con un nivel o actividad de la ruta del sustrato de SPOP en un sujeto de referencia o muestra biológica de referencia. En algunas modalidades, el sujeto de referencia no alberga o no se sospecha que albergue una enfermedad asociada con niveles elevados de sustrato de SPOP. En algunas modalidades, la muestra biológica de referencia se deriva de un tejido no enfermo del sujeto que necesita una regulación negativa del sustrato de SPOP. En algunas modalidades, el nivel o la actividad de la vía del sustrato de SPOP en el sujeto o muestra biológica derivada del sujeto se considera elevado si la actividad de la vía o nivel es mayor que un nivel umbral o actividad de la ruta del sustrato de SPOP. Los expertos en la técnica pueden determinar el nivel umbral o la actividad de la ruta, por ejemplo, teniendo en cuenta un intervalo o un promedio de los niveles de actividad de la ruta de sustrato o sustrato de SPOP que se encuentran en una cohorte de sujetos que no necesitan regulación negativa de la SPOP.

30 En algunas modalidades, el nivel o la actividad de la vía del sustrato de SPOP en el sujeto o muestra biológica derivada del sujeto es 5-50% más alto, 40-100% más alto, 80-200% más alto, 100-500% más alto, 400-1000%, más alto o más de 1000% más alto que un nivel o actividad de la ruta del sustrato de SPOP en un sujeto de referencia o muestra biológica de referencia. En algunas modalidades, el nivel o la actividad de la vía del sustrato de SPOP en el sujeto o muestra biológica derivada del sujeto es 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160 %, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, o más del 1000% más alto que un nivel o actividad de la ruta del sustrato de SPOP en un sujeto de referencia o muestra biológica de referencia.

40 El sujeto o muestra biológica derivada del sujeto puede exhibir una actividad elevada de la ruta del sustrato de SPOP. Como se describe en la presente descripción, la ruta del sustrato de SPOP que se eleva puede ser una ruta de señalización del receptor de andrógenos. La señalización del receptor de andrógenos puede determinarse de varias maneras, como se describe en la presente descripción o se conoce de cualquier otra manera en la técnica.

45 En algunas modalidades, la ruta del sustrato de SPOP que se eleva resulta en la inhibición de la muerte celular, por ejemplo, la inhibición mediada por AWP1 de las rutas inducidas por TNF $\alpha$ . Las rutas inducidas por TNF $\alpha$  ejemplares se describen en la presente descripción. Los métodos para evaluar la muerte celular se describen en la presente descripción.

50 En algunas modalidades, el sujeto que necesita una regulación negativa de un nivel de sustrato de SPOP o su actividad de la ruta, o una muestra biológica derivada del sujeto, exhibe una o más mutaciones de la SPOP. Una o más mutaciones de la SPOP pueden incluir una mutación en un polinucleótido (por ejemplo, ADN o ARN) que codifica una proteína de la SPOP (por ejemplo, un gen de la SPOP). La mutación puede afectar a cualquier porción del gen de la SPOP. Una o más mutaciones de la SPOP pueden incluir una mutación en la proteína SPOP. Una o más mutaciones de la SPOP pueden ser una mutación puntual, una inserción, una eliminación, una amplificación, una translocación, una inversión o pérdida de heterocigosidad. En algunas modalidades, la mutación es una pérdida de función o una mutación negativa dominante. La mutación puede ser una mutación con cambio del marco de lectura. Una mutación con cambio del marco de lectura puede alterar el marco de lectura, lo que resulta en una proteína traducida completamente diferente en comparación con la secuencia original. La mutación puede ser una mutación sin sentido. La mutación sin sentido puede resultar en un codón de parada prematuro, codificando así un producto proteico truncado y posiblemente no funcional. La mutación de la SPOP puede ser una mutación sin sentido, en donde una sola alteración de nucleótidos provoca una sustitución de aminoácidos en la proteína traducida. La mutación puede causar una alteración en el dominio MATH de la proteína SPOP. La mutación puede alterar una secuencia de aminoácidos entre las posiciones 31-161 de la secuencia de aminoácidos de la SPOP. La mutación puede causar una sustitución en Y87, F102, S119, F125, K129, W131, F133 y/o K134 de la secuencia de aminoácidos de la SPOP. En algunas modalidades, la mutación causa una sustitución Y87C, una sustitución Y87N, una sustitución F102C, una sustitución S119N, una sustitución F125V, una sustitución K129N, una sustitución W131G, una sustitución F133L, una sustitución F133V, o cualquier combinación de sus sustituciones. La mutación puede reducir la eficacia de la unión de

una proteína SPOP con un sustrato de SPOP. La mutación puede reducir la capacidad de la SPOP para facilitar la ubiquitinación del sustrato de SPOP. La mutación puede reducir la degradación del sustrato de SPOP.

La presencia de una mutación de la SPOP puede determinarse por cualquier medio conocido en la técnica, incluidos los ensayos de genotipado y los métodos de secuenciación. Los métodos de secuenciación pueden incluir la secuenciación de próxima generación, secuenciación dirigida, secuenciación del exoma, secuenciación del genoma completo, secuenciación masivamente paralela y similares. Varias plataformas para la secuenciación de la próxima generación están disponibles en el comercio. Las plataformas disponibles en el comercio incluyen, por ejemplo, plataformas para secuenciación por síntesis, secuenciación de semiconductores iónicos, pirosecuenciación, secuenciación de terminador de tinte reversible, secuenciación por ligación, secuenciación de una sola molécula, secuenciación por hibridación, y secuenciación de nanoporos. Las plataformas para secuenciar por síntesis están disponibles de, por ejemplo, Illumina, 454 Life Sciences, Helicos Biosciences y Qiagen. Las plataformas Illumina pueden incluir, por ejemplo, la plataforma Solexa de Illumina, el analizador del Genoma de Illumina, y se describen en Gudmundsson y otros (Nat. Genet. 2009 41: 1122-6), Out y otros (Hum. Mutat. 2009 30: 1703-12) y Turner (Nat. Methods 2009 6: 315-6), solicitud de patente de Estados Unidos núms. US20080160580 y US20080286795, patentes de Estados Unidos núms. 6306597, 7115400 y 7232656. Las plataformas 454 Life Science incluyen, por ejemplo, GS Flex y GS Junior, y se describen en la Patente de Estados Unidos núm. 7,323,305. Las plataformas de Helicos Biosciences incluyen la plataforma de Secuenciación de una Única Molécula. Las plataformas para la secuenciación de semiconductores iónicos incluyen, por ejemplo, la Máquina de Genoma Personal Ion Torrent (PGM) y se describen en la Patente de Estados Unidos núm. 7948015. Las plataformas para la pirosecuenciación incluyen el sistema GS Flex 454 y se describen en las patentes de Estados Unidos núms. 7211390; 7244559; 7264929. Las plataformas y los métodos para la secuenciación por ligación incluyen, por ejemplo, la plataforma de secuenciación SOLiD y se describen en la Patente de Estados Unidos núm. 5750341. Las plataformas para la secuenciación de una única molécula incluyen el sistema SMRT de Pacific Bioscience y la plataforma Helicos de Secuenciación de una única molécula. Las metodologías de secuenciación de nanoporos se describen en Soni GV y Meller A. Clin Chem 53: 1996-2001 [2007]. Las técnicas de análisis de ADN de secuenciación de Nanopore están siendo desarrolladas industrialmente por varias compañías, que incluyen Oxford Nanopore Technologies (Oxford, Reino Unido). La secuenciación de nanoporos generalmente se refiere a una tecnología de secuenciación de una única molécula por la cual una única molécula de ADN se secuencia directamente cuando pasa a través de un nanoporo. Un nanoporo puede ser un agujero pequeño, del orden de 1 nanómetro de diámetro. La inmersión de un nanoporo en un fluido conductor y la aplicación de un potencial (voltaje) a través de la corriente pueden ocasionar una ligera corriente eléctrica debido a la conducción de iones a través del nanoporo. La cantidad de corriente que fluye es sensible al tamaño y forma del nanoporo y a la oclusión, por ejemplo, por una molécula de ADN. Cuando una molécula de ADN pasa a través de un nanoporo, cada nucleótido en la molécula de ADN puede obstruir el nanoporo en un grado diferente, cambiando la magnitud de la corriente a través del nanoporo en diferentes grados. Así, este cambio en la corriente a medida que la molécula de ADN pasa a través del nanoporo representa una lectura de la secuencia de ADN. Si bien el método automatizado de Sanger se considera una tecnología de 'primera generación', la secuenciación de Sanger, que incluye la secuenciación automática de Sanger, además puede emplearse mediante el método de la invención.

Cualquiera de los sujetos descritos en la presente descripción puede sufrir, ser diagnosticado, sospechoso de tener o ser sospechoso de estar en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada con niveles aberrantemente altos de un sustrato de SPOP. El sujeto puede, por ejemplo, diagnosticarse con, ser sospechoso de tener, o sospechoso de estar en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada con niveles aberrantemente altos de SRC3. Las enfermedades ejemplares asociadas con niveles aberrantemente elevados de SRC3 incluyen, pero sin limitarse a, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer gástrico, y cáncer de páncreas.

Cualquiera de los sujetos descritos en la presente descripción puede ser un animal. El animal puede ser un vertebrado. Los vertebrados ejemplares incluyen anfibios, aves, mamíferos, y reptiles. Los mamíferos ejemplares incluyen, pero sin limitarse a ratones, conejos, cobayas, gatos, perros, cerdos, ovejas, caballos, vacas, humanos, y monos. Los anfibios ejemplares incluyen, pero sin limitarse a ranas, sapos, salamandras, y tritones. Los reptiles ejemplares incluyen, pero sin limitarse a lagartos, serpientes, y tortugas. Las aves ejemplares incluyen, pero sin limitarse a pollos, aves acuáticas, pinzones, pájaros cantores, gavilanes, halcones y águilas. En algunas modalidades, el sujeto es un invertebrado, por ejemplo, Caenorhabditis elegans o un insecto tal como, por ejemplo, Drosophila melongaster.

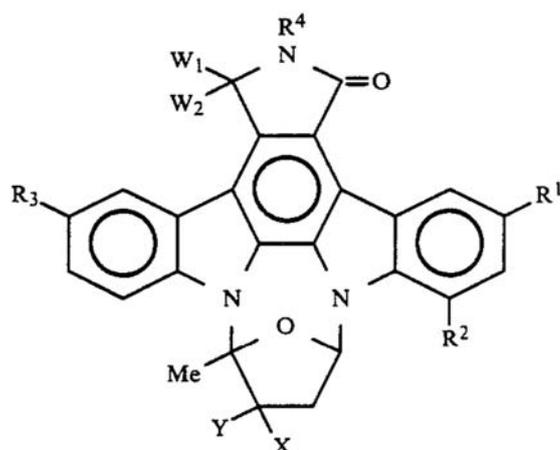
Compuestos ejemplares

Generalmente, los métodos de la descripción comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos aspectos, el método descrito comprende administrar a una célula tumoral una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos aspectos, un compuesto de Fórmula I es:

5

10

15



(I),

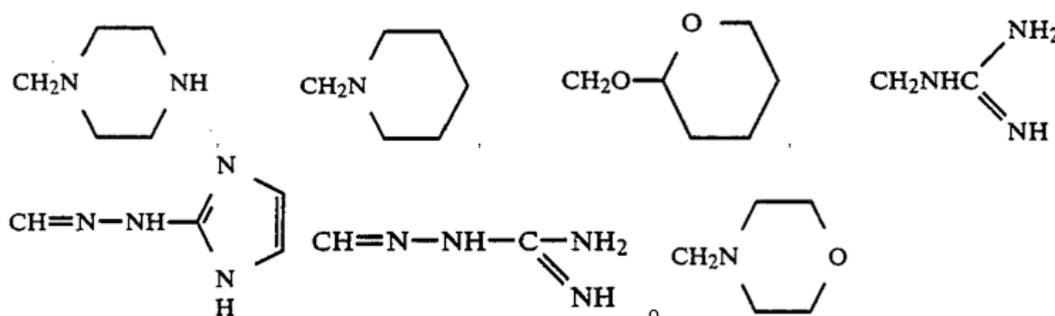
20

en donde  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ , y  $R^4$  son independientemente H, acetilo, amido, un halogeno,  $\text{CONH}_2$ , OH,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ , en donde  $W^1$  y  $W^2$  son independientemente H, O,  $\text{O}_2$ , en donde X es OH,  $\text{CONHOH}$ ,  $\text{CONH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CO}_2\text{Et}$ ,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CH}_2\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$ ,  $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CH}_2\text{N} = \text{CH-NMe}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $\text{CH}_2\text{NHMe}$ ,  $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH} = \text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{SMe}$ ,  $\text{CH}_2\text{S}(\text{O})\text{Me}$ ,  $-\text{O}-$ ,

25

30

35



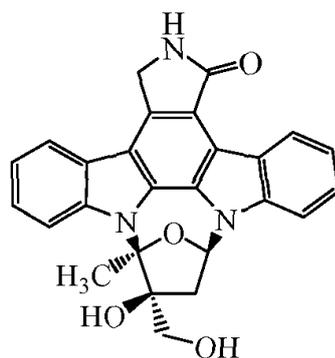
40

En algunos aspectos, cada uno de  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ , y  $R^4$  son H,  $W^1$  y  $W^2$  son H, X es  $\text{CH}_2\text{OH}$ , y la Y es OH.

45

50

55



(II).

60

Tales compuestos generalmente se denominan en la presente descripción como "lestaurtinib", "CEP-701"; "KT-5555"; "SPM-924". Tales compuestos, y los métodos para fabricar los compuestos, se describen en la Patente de Estados Unidos núm. 4923986, Publicación PCT núms. WO2007075307, WO2008086510. Generalmente, lestaurtinib puede formularse como base libre o formas de sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables se describen en la presente descripción.

65

Los compuestos de Fórmula I o Fórmula II (por ejemplo, lestaurtinib) pueden comprarse a través de varios proveedores para la fabricación de la composición farmacéutica. Por ejemplo, lestaurtinib se lista en el registro CAS (CAS # 111358-88-4). Puede comprarse Lestaurtinib de, por ejemplo, Tocris Biosciences (# de catálogo 3395), LC Laboratories (# de catálogo L-6307), Cayman Chemical (# de catálogo 12094), BioVision, Inc. (# de catálogo 1805-1000), y Santa Cruz

Biotech (# de catálogo sc-218657), entre otros. En algunas modalidades, los compuestos o composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de Fórmula I o Fórmula II pueden fabricarse por Cephalon, Inc. o Abbott Laboratories, Inc.

## 5 Composiciones Farmacéuticas

Generalmente, los métodos de la invención utilizan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib. Las composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I o Fórmula II pueden incluir un portador farmacéuticamente aceptable. El portador farmacéuticamente aceptable para las presentes composiciones puede incluir, pero no se limita a, aminoácidos, péptidos, polímeros biológicos, polímeros no biológicos, azúcares simples o almidones, sales inorgánicas y gomas, que pueden estar presentes individualmente o en sus combinaciones. Los péptidos usados en el portador aceptable pueden incluir, por ejemplo, gelatina y/o albúmina. Puede usarse celulosa o sus derivados en el portador farmacéuticamente aceptable. El azúcar usado en el portador aceptable puede ser lactosa y/o glucosa. Otros azúcares útiles que pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas incluyen, pero sin limitarse a, fructosa, galactosa, lacticol, maltitol, maltosa, manitol, melezitosa, mioinositol, palatinato, rafinosa, estaquiosa, sacarosa, tehalosa, xilitol, hidratos de estos, y sus combinaciones. Los aglutinantes pueden incluirse en el portador farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de aglutinantes incluyen, pero sin limitarse a, almidones (por ejemplo, almidón de maíz o almidón de patata), gelatina; gomas naturales o sintéticas tales como goma arábica, alginato de sodio, tragacanto en polvo, goma de guar, celulosa o derivados de celulosa (por ejemplo, meticelulosa, etil celulosa, acetato de celulosa); celulosa microcristalina, polivinil pirrolidona, y sus mezclas. Las sales inorgánicas usadas en el portador aceptable pueden ser una sal de magnesio, por ejemplo, cloruro de magnesio o sulfato de magnesio. Pueden usarse otras sales inorgánicas, por ejemplo, sales de calcio. Los ejemplos de sales de calcio incluyen, pero sin limitarse a, cloruro de calcio, sulfato de calcio. Otros ejemplos de sustancias que pueden usarse en el portador farmacéuticamente aceptable incluyen, pero sin limitarse a, aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de oliva, aceite de maíz; polioles tales como glicerina, propilenglicol, polietilenglicol; agua libre de pirógenos, solución salina isotónica, soluciones tampón de fosfato; emulsionantes, tales como los Tweens®; agentes humectantes, lubricantes, colorantes, agentes aromatizantes, conservantes.

El término "agentes humectantes" puede usarse de manera intercambiable con "surfactantes", y se refiere a sustancias que disminuyen la tensión superficial de un líquido, lo que permite así que el líquido se propague más fácilmente. Los surfactantes que puede usarse para formar composiciones farmacéuticas y formas de dosificación de la invención incluyen, pero no se limitan a, surfactantes hidrófilos, surfactantes lipófilos, y sus mezclas. O sea, puede emplearse una mezcla de surfactantes hidrófilos, puede emplearse una mezcla de surfactantes lipófilos, o puede emplearse una mezcla de al menos un surfactante hidrófilo y al menos un surfactante lipófilo.

Un surfactante hidrófilo adecuado puede tener generalmente un valor HLB de al menos 10, aunque los surfactantes hidrófilos adecuados puede tener generalmente un valor HLB de o menor que aproximadamente 10. Un parámetro útil que puede usarse para caracterizar la hidrofiliidad e hidrofobicidad relativa de los compuestos anfífilos no iónicos es el balance hidrófilo-lipófilo (valor "HLB"). Los surfactantes con valores HLB inferiores son más hidrofóbicos, y tienen una solubilidad mayor en aceites, mientras que los surfactantes con valores HLB superiores son más hidrófilos, y tienen mayor solubilidad en soluciones acuosas. Los surfactantes hidrófilos se consideran generalmente como los compuestos que tiene un valor HLB mayor que aproximadamente 10, así como también compuestos aniónicos, catiónicos, o zwitteriónicos para los cuales la escala HLB generalmente no es aplicable. Similarmente, los surfactantes lipófilos (es decir, hidrofóbicos) se consideran generalmente compuestos que tiene un valor HLB igual a o menor que aproximadamente 10. Sin embargo, el valor HLB de un surfactante meramente proporciona una guía aproximada generalmente usada para permitir la formulación de emulsiones industriales, farmacéuticas y cosméticas.

Los surfactantes hidrófilos pueden ser ya sea iónicos o no iónicos. Los surfactantes iónicos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, sales de alquilamonio, derivados de ácidos grasos de aminoácidos, derivados de glicéridos de aminoácidos, sales de ácido fusídico, oligopéptidos, y polipéptidos, oligopéptidos, y polipéptidos, lecitinas y lecitinas hidrogenadas, lisolinas y lisolecitinas hidrogenadas, fosfolípidos y derivados de estos, sales de ácidos grasos, lisofosfolípidos y derivados de estos, sales de ésteres de ácidos grasos de carnitina, sales de alquilsulfatos, docusato de sodio, acilatos de sodio, ésteres de ácido tartárico mono y diacetilado de mono y diglicéridos, mono y diglicéridos, ésteres de ácido cítrico de mono y diglicéridos, y sus mezclas.

Dentro del grupo antes mencionado, los surfactantes iónicos preferidos incluyen, pero sin limitarse a, lecitinas, lisolecitina, fosfolípidos, lisofosfolípidos y derivados de estos, sales de éster de ácido graso de carnitina, sales de ácidos grasos, sales de alquilsulfatos, docusato de sodio, acilactilatos, esterres de ácido tartárico mono, y diacetilado de mono y diglicéridos, ésteres succinilados de mono y diglicéridos, ésteres de ácido cítrico de mono y diglicéridos; y sus mezclas.

Los surfactantes iónicos pueden ser formas ionizadas de ésteres lactílicos de ácidos grasos, lecitina, lisolecitina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilserina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico, PEG-fosfatidiletanolamina, PVP-fosfatidiletanolamina, estearoil-2-lactilato, estearoil lactilato, monoglicéridos succinilados, ésteres de ácido tartárico de mono/diacetilado de mono/diglicéridos, ésteres de ácido cítrico de mono/diglicéridos, colilsarcosina, caproato,

caprilato, caprato, laurato, miristato, palmitato, oleato, linoleato, linolenato, estearato, ricinoleato, lauril sulfato, teracecil sulfato, docusato, lauroil carnitinas, palmitoil carnitinas, miristoil carnitinas, y sales y mezclas de estos.

5 Los surfactantes no iónicos hidrófilos pueden incluir, pero sin limitarse a, alquilglucósidos, alquiltioglucoídos, alquilmaltósidos, lauril macroglicéridos, alquil éteres de polioxialquileno tales como alquil éteres de polietilenglicol, alquilfenoles de polioxialquileno tales como alquil fenoles de polietilenglicol, ésteres de ácido graso de polietilenglicol glicerol, ésteres de ácido graso de polialquileno alquilfenol, tales como monoésteres de ácido graso de polietilenglicol y diésteres de ácido graso de polietilenglicol, ésteres de ácido graso de poliglicerol, copolímeros de bloque polietileno-polioxipropileno y sus mezclas, ésteres de ácido graso de polioxialquileno sorbitán tales como éster de ácido graso de polietilenglicol sorbitán; productos de transesterificación hidrófilos de un poliol con al menos un miembro del grupo que  
10 consiste en glicéridos, aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, ácidos grasos, y esteroides, esteroides de polioxietileno y derivados o análogos de estos, vitaminas polioxietiladas y derivados de estas, éster de ácido graso de polietilenglicol sorbitán y productos de transesterificación hidrófilos de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en triglicéridos, aceites vegetales, y aceites vegetales hidrogenados. El poliol puede ser glicerol,  
15 etilenglicol, polietilenglicol, sorbitol, propilenglicol, pentaeritrita, o un sacárido.

Otros surfactantes no iónicos hidrófilos incluyen, sin limitarse a, PEG-10 laurato, PEG-12 laurato, PEG-12 oleato, PEG-15 oleato, PEG-20 oleato, PEG-20 laurato, PEG-32 dilaurato, PEG-32 laurato, PEG-20 dioleato, PEG-32 oleato, PEG-200 oleato, PEG-400 oleato, PEG-15 estearato, PEG-32 diestearato, PEG-40 estearato, PEG-100 estearato, PEG-20 dilaurato, PEG-25 gliceril trioleato, PEG-32 dioleato, PEG-20 gliceril laurato, PEG-20 trioleato, PEG-30 gliceril laurato, PEG-40 gliceril laurato, PEG-20 gliceril estearato, PEG-20 gliceril oleato, PEG-30 gliceril oleato, PEG-30 gliceril laurato, PEG-40 gliceril laurato, PEG-50 aceite de ricino hidrogenado, PEG-40 aceite de ricino, PEG-35 aceite de ricino, PEG-60 aceite de ricino, PEG-40 aceite de semilla de palma, PEG-40 aceite de ricino hidrogenado, PEG-60 aceite de ricino hidrogenado, PEG-60 aceite de maíz, PEG-6 glicéridos de caprato/caprilato, PEG-8 glicéridos de caprato/caprilato, poligliceril-10  
20 laurato, PEG-30 colesterol, PEG-25 fito esteroles, PEG-30 esteroles de soya, PEG-40 sorbitán oleato, PEG-80 sorbitán laurato, polisorbato 20, polisorbato 80, POE-9 lauril éter, POE-23 lauril éter, POE-10 oleil éter, POE-20 oleil éter, POE-20 estearil éter, tocoferil PEG-100 succinato, PEG-24 colesterol, poligliceril-10oleato, Tween 40, Tween 60, monoestearato de sacarosa, monolaurato de sacarosa, monopalmitato de sacarosa, series de nonil fenol PEG 10-100, series de octil fenol PEG 15-100, y poloxámeros.  
25  
30

Los surfactantes lipofílicos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, alcoholes grasos; ésteres de ácido graso de glicerol, ésteres de ácido graso de glicerol acetilados, ésteres de ácido graso de alcohol de cadena corta; ésteres de ácido graso de propilenglicol; éster de ácido graso de sorbitán, éster graso de polietilenglicol sorbitán, esteroides y derivados de esteroles, esteroides polioxietilados y derivados de esteroles, éteres de alquil polietilenglicol, éteres de azúcar, ésteres de azúcar, productos de transesterificación hidrofóbicos de un poliol con al menos un miembro del grupo que  
35 consiste en glicéridos, aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, ácidos grasos y esteroides, derivados de vitaminas solubles en aceite/vitamina, derivados de ácido láctico de mono y diglicéridos, y sus mezclas. Dentro de este grupo, los surfactantes lipofílicos preferidos incluyen ésteres de ácido graso de glicerol, ésteres de ácido graso de propilenglicol, y mezclas de estos, o son productos de transesterificación hidrofóbicos de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, y triglicéridos.  
40

Los lubricantes que pueden usarse en la composición farmacéutica incluyen, pero sin limitarse a, agar, estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, laurilsulfato sódico, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz, y aceite de soya), estearato de zinc, oleato de etilo, laureato de etilo, o sus mezclas. Los lubricantes adicionales incluyen, a modo de ejemplo, un gel de sílice siloide, un aerosol coagulado de sílice sintético, o sus mezclas. Un lubricante puede añadirse opcionalmente, en una cantidad de menos de aproximadamente 1 por ciento en peso de la composición farmacéutica.  
45

La composición puede incluir un solubilizador para asegurar la buena solubilización del compuesto y para reducir la precipitación del compuesto de la presente invención. Puede usarse un solubilizante para aumentar la solubilidad del compuesto u otros ingredientes activos, o puede usarse para mantener la composición como una solución o dispersión homogénea. Los ejemplos de solubilizantes adecuados incluyen, pero sin limitarse a, alcoholes y polioles tales como etanol, isopropanol, alcohol polivinílico, gelatina, manitol, carboximetilcelulosa sódica (CMCNa), povidona, propilenglicol, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, glicerina, ciclodextrina o derivados de ciclodextrina, éteres de polietilenglicol de peso molecular que promedian aproximadamente 200 a aproximadamente 6000, tales como PEG, amidas y otros compuestos que contienen nitrógeno, tales como 2-pirrolidona, 2-piperidona, épsilon.-caprolactama, N-alquilpirrolidona, N-hidroalquilpirrolidona, N-alquilpiperidona, N-alquicaprolactama, dimetilacetamida y polivinilpirrolidona, ésteres tales como el propionato de etilo, tributilcitrato, trietilcitrato de acetilo, tributil citrato de acetilo, etiloleato, etilcaprilato, etil butirato, triacetina, monoacetato de propilenglicol, diacetato de propilenglicol, ε-caprolactona e isómeros de estos, δ-valerolactona e isómeros de estos, β-butilolactona e isómeros de estos, y otros solubilizantes conocidos en la técnica, tales como dimetil acetamida, dimetil isosorbida, N-metil pirrolidonas, mono-octanoína, dietilenglicol monoetil éter, agua o mezclas y/o sus combinaciones.  
50  
55  
60

Las mezclas de solubilizantes además pueden usarse. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, etil oleato, etil caprilato, triacetina, trietilcitrato, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, N-hidroxi-etilpirrolidona, polivinilpirrolidona,  
65

hidroxipropil metilcelulosa, hidroxipropil ciclodextrinas, etanol, polietilenglicol 200-100, glicofurolo, transcutole, propilenglicol, y dimetil isosorbida. Los solubilizantes particularmente preferidos sorbitol, glicerol, triacetina, alcohol etílico, PEG-400, glicofurolo y propilenglicol.

5 La cantidad de solubilizante que puede incluirse no está particularmente limitada. La cantidad de un agente solubilizante dado puede estar limitada a una cantidad bioaceptable, que puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica. En algunas circunstancias, puede ser ventajoso incluir cantidades de solubilizantes muy por encima de las cantidades bioaceptables, por ejemplo, para maximizar la concentración del fármaco, con el exceso de solubilizante eliminado antes de proporcionar la composición a un sujeto con el uso de técnicas convencionales, tales como destilación o evaporación. Así, si está presente, el solubilizante puede estar en una relación en peso de 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, o hasta aproximadamente 200 % en peso, basado en el peso combinado del fármaco, y otros excipientes. Si se desea, además pueden usarse cantidades muy pequeñas de solubilizante, tales como 5%, 2%, 1% 0,5% o incluso menos. Típicamente, el solubilizante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 100%, más típicamente aproximadamente 5% a aproximadamente 25% en peso.

15 La composición puede incluir uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables, que pueden incluir, pero sin limitarse a, dispersantes, agentes antiespumantes, agentes de tamponamiento, antioxidantes, polímeros, conservantes, agentes quelantes, odorantes, opacificantes, agentes de suspensión, rellenos, plastificantes, y sus mezclas.

20 En algunas modalidades, el portador farmacéuticamente aceptable comprende más del 90%, más del 80%, más del 70%, más del 60%, más del 50%, más del 40%, más del 30%, más del 20%, más del 10%, más del 9%, más del 8%, más del 6%, más del 5%, más del 4%, más del 3%, más del 2%, más del 1%, más del 0,5%, más del 0,4%, más del 0,3%, más del 0,2%, más del 0,1%, más del 0,09%, más del 0,08%, más del 0,07%, más del 0,06%, más del 0,05%, más del 0,04%, más del 0,03%, más del 0,02%, más del 0,01%, más del 0,009%, más del 0,008%, más del 0,007%, más del 0,006%, más del 0,005%, más del 0,004%, más del 0,003%, más del 0,002%, más del 0,001%, más del 0,0009%, más del 0,0008%, más del 0,0007%, más del 0,0006%, más del 0,0005%, más del 0,0004%, más del 0,0003%, más del 0,0002%, o más del 0,0001% de la composición farmacéutica en p/p, p/v o v/v.

30 En algunas modalidades, la concentración del compuesto de Fórmula I o Fórmula II en la composición comprende menos del 100%, menos del 90%, menos del 80%, menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 10%, menos del 9%, menos del 8%, menos del 6%, menos del 5%, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2%, menos del 1%, menos del 0,5%, menos del 0,4%, menos del 0,3%, menos del 0,2%, menos del 0,1%, menos del 0,09%, menos del 0,08%, menos del 0,07%, menos del 0,06%, menos del 0,05%, menos del 0,04%, menos del 0,03%, menos del 0,02%, menos del 0,01%, menos del 0,009%, menos del 0,008%, menos del 0,007%, menos del 0,006%, menos del 0,005%, menos del 0,004%, menos del 0,003%, menos del 0,002%, menos del 0,001%, menos del 0,0009%, menos del 0,0008%, menos del 0,0007%, menos del 0,0006%, menos del 0,0005%, menos del 0,0004%, menos del 0,0003%, menos del 0,0002% o menos del 0,0001% de la composición farmacéutica en p/p, p/v o v/v.

40 En algunas modalidades, la concentración del compuesto de Fórmula I o Fórmula II está en el intervalo de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 50%, aproximadamente 0,001% a aproximadamente 40%, aproximadamente 0,01% a aproximadamente 20%, aproximadamente 0,02% a aproximadamente 29%, aproximadamente 0,03% a aproximadamente 28%, aproximadamente 0,04% a aproximadamente 27%, aproximadamente 0,05% a aproximadamente 26%, aproximadamente 0,06% a aproximadamente 25%, aproximadamente 0,07% a aproximadamente 24%, aproximadamente 0,08% a aproximadamente 23%, aproximadamente 0,09% a aproximadamente 22%, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 21%, aproximadamente 0,2% a aproximadamente 20%, aproximadamente 0,3% a aproximadamente 19%, aproximadamente 0,4% a aproximadamente 18%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 17%, aproximadamente 0,6% a aproximadamente 16%, aproximadamente 0,7% a aproximadamente 15%, aproximadamente 0,8% a aproximadamente 14%, aproximadamente 0,9% a aproximadamente 12%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 10% de la composición farmacéutica en p/p, p/v o v/v.

55 En algunas modalidades, la concentración del compuesto de Fórmula I o Fórmula II está en el intervalo de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 5%, aproximadamente 0,001% a aproximadamente 4%, aproximadamente 0,01% a aproximadamente 2%, aproximadamente 0,02% a aproximadamente 1%, o aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,5% de la composición farmacéutica en p/p, p/v o v/v.

60 En algunas modalidades, la cantidad del compuesto de Fórmula I o Fórmula II en la composición farmacéutica es de aproximadamente 0,00001 mg, 0,0001 mg, 0,001 mg, 0,005 mg, 0,01 mg, 0,05 mg, 0,1 mg, 0,25 mg, 0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 4 mg, 8 mg, 10 mg, 12 mg, 14 mg, 16 mg, 18 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 65 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1 g, 1,1 g, 1,2 g, 1,3 g, 1,4 g, 1,5 g, 1,6 g, 1,7 g, 1,8 g, 1,9 g, 2 g, 2,5 g, 3 g, 3,5 g, 4 g, 4,5 g, 5 g, 6 g, 7 g, 8 g, 9 g, o 10 g.

65 Se describen más abajo algunos ejemplos de composiciones farmacéuticas.

Composiciones farmacéuticas para la administración oral.

La composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula II puede formularse para la administración oral. En algunas modalidades, la composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula II para la administración oral es una composición farmacéutica sólida. En algunas modalidades, la composición farmacéutica sólida puede presentarse como formas de dosificación oral discretas (por ejemplo, una unidad). Los ejemplos no limitantes de formas de dosificación oral discretas incluyen tabletas, cápsulas, comprimidos, cápsulas de gelatina, formulaciones de liberación sostenida, pastillas, películas delgadas, paletas, y goma de mascar.

Las formas de dosificación oral discretas, tales como las tabletas, pueden recubrirse con técnicas conocidas para retrasar o prolongar la absorción en el tracto gastrointestinal, proporcionando así una acción sostenida de un período de tiempo más largo. En algunas modalidades, el compuesto de Fórmula II se mezcla con uno o más diluyentes sólidos inertes, tales como carbonato de calcio o fosfato de calcio. En algunas modalidades, el compuesto de Fórmula II se presenta como cápsulas de gelatina blanda, en donde el compuesto se mezcla con agua o un medio de aceite, tal como aceite de cacahuete, o aceite de oliva, por ejemplo.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula II para la administración oral es una composición farmacéutica líquida. Los ejemplos de composiciones líquidas para la administración oral incluyen suspensiones hidrófilas, emulsiones, líquidos, geles, jarabes, pastas, soluciones, elixires, geles blandos, tinturas, e hidrogeles. En algunas modalidades, las composiciones sólidas o líquidas que comprenden una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula II para la administración oral comprenden diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, o agentes colorantes. Los ejemplos de agentes colorantes incluyen colorantes adecuados para alimentos tales como los conocidos como colorantes F.D. & C. y agentes colorantes naturales tales como extracto de piel de uva, polvo de remolacha roja, betacaroteno, annato, carmín, cúrcuma, paprika, etc. Además pueden usarse derivados, análogos e isómeros de cualquiera de los compuestos coloreados anteriores.

Tales formas de dosificación pueden prepararse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, en una farmacia. Tales métodos comprenderían asociar el compuesto de Fórmula II con el portador farmacéuticamente aceptable.

Esta invención abarca además las composiciones farmacéuticas anhidras y formas de dosificación que comprenden una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula II, ya que el agua puede facilitar la degradación de los compuestos. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas anhidras y las formas de dosificación de la invención se preparan con el uso de ingredientes anhidros o que tienen poco contenido de humedad. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas anhidras y las formas de dosificación de la invención se preparan en condiciones de humedad baja o contenido de humedad baja. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que contienen lactosa pueden hacerse anhidra si se espera contacto sustancial con el contenido de humedad y/o humedad durante la fabricación, envasado, y/o almacenamiento. Una composición farmacéutica anhidra que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula II puede prepararse y almacenarse de manera que se mantenga su naturaleza anhidra. Por ejemplo, las composiciones anhidras pueden envasarse con el uso de materiales que se conoce que evitan la exposición al agua, de manera que pueden incluirse en estuches de formularios adecuados, cuyos ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, láminas herméticamente selladas, plástico o similares, contenedores de dosis unitarias, envases de ampollas, y envases de tiras.

Composiciones farmacéuticas para la inyección o administración parenteral.

En algunos aspectos, la composición farmacéutica se formula para la administración parenteral. "Administración parenteral" generalmente se refiere a otras rutas de administración que no sean el tracto gastrointestinal. Los ejemplos de administración parenteral incluyen, pero sin limitarse a, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, infusión, o implantación. La infusión puede ser intradérmica, o subcutánea, o a través de un implante transdérmico. Las composiciones farmacéuticas ejemplares para la administración parenteral se describen en las siguientes referencias que se incorporan a la presente como referencia: Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2006/0287221, las Patentes de los Estados Unidos núms. 5244925, 4309421, 4158707, y 5164405.

Las composiciones formuladas para la administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas y/o tampones comúnmente usados para la inyección y/o infusión. Los tampones y/o soluciones acuosas de uso común pueden incluir, pero sin limitarse a, soluciones de cloruro de sodio de aproximadamente 0,9%, tampones de fosfato, solución de Ringer lactato, solución de Ringer lactato acetato, solución salina tamponada con fosfato, tampones de citrato, tampones de Tris, tampones de histidina, tampones de HEPES, tampones de glicina, tampones de N-glicilglicina y similares. Otros portadores farmacéuticamente aceptables para la administración parenteral pueden incluir etanol, glicerol, propilenglicol, ciclodextrina y derivados de ciclodextrina, aceites vegetales, y similares.

En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas de inyección y/o infusión contienen conservantes presentes en cantidades que previenen o reducen eficazmente la contaminación o degradación microbiana. Diversos agentes, por ejemplo, fenol, m-cresol, alcohol bencílico, parabenos, clorobutanol, metotrexato, ácido sórbico,

timerosal, etil hidroxibenzoato, tribromofenato de bismuto, metilhidroxibenzoato, bacitracina, hidroxibenzoato de propilo, eritromicina, 5-fluorouracilo, doxorubicina, mitoxantrona, rifamicina, clorocresol, cloruros de benzalconio, pueden usarse para prevenir o reducir la contaminación.

5 En algunas modalidades, las soluciones estériles se preparan mediante la incorporación del compuesto de Fórmula II en la cantidad requerida en el solvente adecuado con varios de los otros ingredientes descritos anteriormente en la presente descripción, según se requieran, seguidos de la esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los  
10 polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, ciertos métodos de preparación preferidos incluyen pero sin limitarse a técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo además de cualquier ingrediente adicional deseado de una solución de este, anteriormente esterilizada por filtración.

Otras composiciones farmacéuticas.

15 Las composiciones farmacéuticas empleadas en la presente invención pueden formularse para la administración intraocular, tópica, rectal, o intranasal. Las formulaciones adecuadas para la administración intraocular incluyen gotas para los ojos en donde el ingrediente activo se disuelve o suspende en un portador adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el ingrediente activo. El ingrediente activo está presente preferentemente en tales  
20 formulaciones en una concentración de 0,5 a 20%, ventajosamente de 0,5 a 10%, particularmente aproximadamente 1,5% p/p. Las formulaciones adecuadas para la administración tópica, por ejemplo, en la boca incluyen pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base saborizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un portador líquido adecuado. Las formulaciones para la  
25 administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende por ejemplo manteca de cacao o un salicilato. Las formulaciones adecuadas para la administración intrapulmonar o nasal pueden tener un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 500 micras (que incluyen tamaños de partículas en un intervalo entre 0,1 y 500 micras en incrementos de micras tales como 0,5, 1, 30 micras, 35 micras, etc.), que se administra mediante inhalación rápida a través de las fosas nasales o por inhalación a través de la boca para llegar a  
30 los sacos alveolares. Las formulaciones adecuadas incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Las formulaciones adecuadas para la administración de aerosol o polvo seco pueden prepararse de acuerdo con métodos convencionales y pueden administrarse con otros agentes terapéuticos tales como los compuestos usados hasta ahora en el tratamiento o la profilaxis de infecciones cancerosas como se describe más abajo. Las preparaciones de tales  
35 composiciones farmacéuticas de describen en, por ejemplo, Anderson, Philip O.; Knoben, James E.; Troutman, William G, eds., Handbook of Clinical Drug Data, Décima Edición, McGraw-Hill, 2002; Pratt y Tailor, eds., Principles of Drug Action, Tercera Edición, Churchill Livingstone, Nueva York, 1990; Katzung, ed., Basic and Clinical Pharmacology, Novena Edición, McGraw Hill, 20037ybg; Goodman y Gilman, eds., The Pharmacological Basis of Therapeutics, Décima Edición, McGraw Hill, 2001; Remingtons Pharmaceutical Sciences, 20ma Ed., Lippincott Williams Wilkins., 2000; Martindale, The Extra Pharmacopoeia, Tercera-Segunda Edición (The Pharmaceutical Press, Londres, 1999).

40 Regímenes de tratamientos ejemplares y rutas de administración.

La administración de cada compuesto o composición farmacéutica de la presente invención puede realizarse mediante cualquier método que permita el suministro del compuesto al sitio de acción. La composición puede administrarse por  
45 vía oral, intraperitoneal, parenteral, intraocular, tópica, rectal o intranasal. En algunas modalidades, la composición se administra por vía oral. En algunos casos, la administración oral puede comprender la administración de cualquiera de las formas de dosificación oral como se describe en la presente descripción. La cantidad eficaz del compuesto de Fórmula I o Fórmula II administrada dependerá del sujeto que se trate, la gravedad del trastorno o afección, la velocidad de administración, la disposición del compuesto y el criterio del médico que prescribe. A un sujeto puede  
50 administrarse una dosis diaria de lestaurtinib. La dosis diaria puede ser de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día. La dosis diaria puede ser de aproximadamente 0,01 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal por día. Una dosis diaria para un humano adulto puede ser aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 300,  
55 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 mg. Lestaurtinib puede administrarse en una o más formas de dosificación unitaria y además puede administrarse una a diez, una a ocho, una a seis, una a cuatro, una a dos veces al día o una vez al día. Una forma de dosificación unitaria puede comprender aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 mg de lestaurtinib.

60 Las dosis de lestaurtinib además pueden estar en forma de líquidos o suspensiones en una concentración de entre 15 a 25 mg/mL, 16 mg/mL o 25 mg/mL. Las formas de dosificación líquida o en suspensión de lestaurtinib pueden incluir el equivalente de las dosis (mg) descritas anteriormente. Por ejemplo, las dosis de lestaurtinib pueden incluir de 1 a 5 mL de la solución de 25 mg/mL, o 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, o 4 mL de la solución de 25 mg/mL, en donde puede proporcionarse una dosis de 60 mg de lestaurtinib en 2,4 mL de solución, puede  
65 proporcionarse una dosis de 80 mg de lestaurtinib en 3,2 mL de solución y puede proporcionarse una dosis de 100

mg de lestaurtinib en 4 mL de solución. Además, puede proporcionarse una dosis de 20 mg de lestaurtinib con 1,25 mL de una solución de 16 mg/mL.

5 En algunas modalidades, la administración puede comprender la infusión. En algunos casos, la infusión puede implicar dosificación crónica y constante. Los dispositivos para la dosificación crónica, constante, es decir, mediante una bomba controlada, son conocidos en la técnica (los ejemplos pueden describirse en los documentos de patente US 7341577, US7351239, US8058251).

10 La administración del(de los) compuesto(s) de la invención puede continuar por el tiempo que sea necesario. En algunas modalidades, el(los) compuesto(s) de la invención se administra(n) por más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, o 28 días. En algunas modalidades, el(los) compuesto(s) de la invención se administra(n) durante más de 1 mes, más de 2 meses, más de 4 meses, más de 6 meses, más de 1 año, más de 2 años, o más de 5 años. En algunas modalidades, el(los) compuesto(s) de la invención se administra(n) durante menos de 1 mes, menos de 2 meses, menos de 4 meses, menos de 6 meses, menos de 1 año, menos de 2 años, o menos de 5 años. En algunas modalidades, el(los) compuesto(s) de la invención se administra(n) por menos de 28, 14, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 día. En algunas modalidades, un agente de la invención se administra de forma crónica de manera continua, por ejemplo, para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con el nivel elevado de sustrato de SPOP o su actividad de la ruta.

20 Es conocido en la técnica que debido a la variabilidad entre sujetos en la farmacocinética del compuesto, la individualización y/o el ajuste del régimen de dosificación pueden ser necesarios para la terapia óptima. En algunas modalidades, se selecciona una dosis para alcanzar un nivel en suero sanguíneo de aproximadamente 0,05 a 20 µg/mL o de aproximadamente 1 a 20 µg/mL de lestaurtinib en un sujeto.

25 Terapias de combinación ejemplares

30 En algunas modalidades, el método comprende la administración conjunta de un agente adicional y una composición farmacéutica que comprende lestaurtinib. Los agentes adicionales pueden ser: moléculas pequeñas, nutracéuticos, vitaminas, por ejemplo, vitamina D, fármacos, profármacos, productos biológicos, péptidos, miméticos de péptidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, trasplantes de células o tejidos, vacunas, polinucleótidos, moléculas de ADN, moléculas de ARN, (es decir, ARNip, miARN), anticuerpos conjugados a fármacos, toxinas, proteínas de fusión. Los agentes pueden administrarse mediante vectores, que incluyen pero no se limita a vectores plasmídicos, vectores virales, vectores no virales, formulaciones liposomales, formulaciones de nanopartículas, toxinas, radioisótopos terapéuticos, etc.

35 En algunas modalidades, el agente adicional es un agente antineoplásico. Los ejemplos no limitantes de agentes antineoplásicos incluyen agentes que interactúan con la tubulina, inhibidores y agentes de la topoisomerasa, acitretina, alstonina, amonafida, amfetinilo, amsacrina, anquinomicina, antineoplaston, glicinato de afidicolina, asparaginasa, bacarina, batraciclina, benfluoron, benzotript, bromofosfamida, caracemida, clorhidrato de carmetizol, clorsulfaquinoxalona, clanfenur, claviridenona, crisnatol, curaderm, citarabina, citocitina, dacarbazina, datelliptinio, éter dihematoporfirina, dihidrolenperona, dinalina, distamicina, docetaxel, elliprabin, acetato de elliptinio, epotilonas, ergotamina, etopósido, etretinato, fenretinida, nitrato de galio, genkwadafnina, hexadecilfosfolina, inhibidores de la HDAC, homoharringtonina, hidroxurea, ilmofosina, isoglutamina, isotretinoína, leucoregulina, lonidamina, merbarona, derivados de merocianina, metilnilinoacridina, minactivina, mitonafida, mitoquidona, mitoxantrona, mopidamol, motretinida, aminoácidos N-(retinol), dehidroalaninas N-aciladas, nafazatom, derivado de nocodazol, octreotida, oquizanocina, paclitaxel, pancratistatina, pazelliptina, piroxantrona, polihematoporfirina, ácido polipreico, probimano, procarbazona, proglumida, razoxano, retelliptina, espatol, derivados de espirociclopropano, espirogermanio, estripoldinona, superóxido dismutasa, tenipósido, taliblastina, tocotrienol, topotecán, ucrain, sulfato de vinblastina, vincristina, vindesina, vinestramida, vinorelbina, vintriptol, vinzolidina, y witanólidos.

50 En algunas modalidades, el agente adicional es un agente anticanceroso. Los ejemplos no limitantes de agentes anticancerosos incluyen acemanano, aclarubicina, aldesleukina, alemtuzumab, alitretinoína, altretamina, amifostina, amsacrina, anagrelida, anastrozol, ancestim, bexaroteno, broxuridina, capecitabina, celmoleukina, cetorelix, cladribina, clotrimazol, daclizumab, dexrazoxana, dilazep, docosanol, doxilfluridina, bromocriptina, carmustina, citarabina, diclofenaco, edelfosina, edrecolomab, eflornitina, emitefur, exemestano, exisulind, fadrozol, eritropoyetina, filgrastim, finasterida, fosfato de fludarabina, formestano, fotemustina, nitrato de galio, gemcitabina, glicopina, heptaplatina, ácido ibandronico, imiquimod, iobenguano, irinotecán, irsogladino, lanreotida, leflunomida, lenograstim, sulfato de lentinan, letrozol, liarozol, lobaplatin, lonidamina, masoprocol, melarsoprol, metoclopramida, mifepristona, miltefosina, mirimostim, mitoguazona, mitolactol, molgramostim, nafarelin, nartograstim, nedaplatin, nilutamida, noscapina, oprelvekin, osaterona, oxaliplatino, ácido pamidronico, pegaspargasa, pentosan polisulfato de sodio, pentostatin, picibanil, pirarubicina, porfímero de sodio, raloxifeno, raltitrexed, rasburicasa, rituximab, romurtida, sargramostim, sizofurano, sobuzoxana, sonermin, suramin, tasonermin, tazaroteno, tegafur, temoporfin, temozolomida, tenipósido, tetraclorodecaóxido, talidomida, trombopoyetina, timalfasina, tiotropina alfa, topotecán, toremifeno, trastuzumab, treosulfano, tretinoína, trilostano, trimetrexato, ubenimex, valrubicina, verteporfina, y vinorelbina.

65

En algunas modalidades, el agente adicional es un antiandrógeno. Los antiandrógenos ejemplares incluyen bicalutamida, flutamida, espironolactona, acetato de ciproterona, finasterida, dutasterida, enzalutamida, ketoconazol, abiraterona, galeterona y nilutamida.

5 En algunas modalidades, el agente adicional es un agente que promueve la autofagia. El agente promotor de la autofagia puede ser un inhibidor de mTOR o la ruta mTOR. Los inhibidores ejemplares de mTOR y/o inhibidores de la ruta mTOR incluyen, pero sin limitarse a, rapamicina, temsirolimus, umirolimus, zotarolimus, inhibidores de la TOR quinasa tales como, por ejemplo, OSI-027, INK-128, AZD- 8055, AZD-2014, Palomid 529, Pp-242, BEZ235, AZD-8055, BGT226, XL765, GDC-0980, GSK2126458, PF-04691502, PF-05212384 análogos o sus derivados.

10 En algunas modalidades, el agente adicional es un inhibidor de PI3K. Los inhibidores de PI3K ejemplares incluyen, pero sin limitarse a SF1126, SF1101, BEZ235, BKM120, BYL719, BGT-226, XL-147, GDC-0941, ZSTK-474, PX-866, GDC-0980, PKI-587, PF- 04691502, BWT33597, PI-103, CAL-101, GNE-477 o cualquiera de sus derivados.

15 Las dosis del agente adicional y de lestaurtinib pueden variar dependiendo del tipo de agente terapéutico adicional empleado, en la enfermedad o afección que se esté tratando, etc. Pueden usarse cantidades subterapéuticas de uno o ambos del agente adicional y lestaurtinib. Pueden usarse cantidades terapéuticamente eficaces de uno o ambos del agente adicional y lestaurtinib. Lestaurtinib y el agente adicional pueden administrarse ya sea simultánea o secuencialmente. Si se administra secuencialmente, el médico encargado o el cuidador pueden decidir la secuencia apropiada de administrar el compuesto y el agente terapéutico adicional.

Estuches

25 La invención proporciona además estuches. Los estuches de la invención pueden comprender al menos una o más dosis unitarias de una composición farmacéutica descrita en la presente descripción, en un envase adecuado, e instrucciones de uso para llevar a cabo uno o más métodos de la invención. Dichos estuches también pueden incluir información, tal como referencias de literatura científica, materiales de inserción de paquetes, resultados de ensayos clínicos, y/o resúmenes de estos y similares, que indican o establecen las actividades y/o ventajas de la composición, y/o que describen dosificación, administración, efectos secundarios, interacciones medicamentosas u otra información útil para el proveedor de atención médica. Tal información puede basarse en los resultados de varios estudios, por ejemplo, estudios que usan animales experimentales que involucran modelos in vivo y estudios basados en ensayos clínicos en humanos. El estuche puede contener además otro agente. En algunas modalidades, el compuesto de la presente invención y el agente se proporcionan como composiciones separadas en contenedores separados dentro del estuche. En algunas modalidades, el compuesto de la presente invención y el agente se proporcionan como una composición única dentro de un contenedor en el estuche. Los ejemplos de envases adecuados incluyen, pero sin limitarse a, láminas herméticamente selladas, plásticos o similares, envases de dosis unitarias, envases tipo burbujas, y los paquetes de tira.

EJEMPLOS

40 Ejemplo 1: Materiales y Métodos

45 Materiales y líneas celulares: Las líneas celulares de cáncer de próstata, mama y cáncer gástrico y sus fuentes se muestran en la tabla más abajo. La condición de crecimiento de cada línea de células tumorales se muestra en la tabla posterior por recomendación de ATCC. Estaurosporina (de Sigma, Núm de Cat. S4400-1mg, Núm. de Lote 017k4059) y Lestaurtinib (de Sigma, Núm de Cat. C7869-1mg, Núm de Lote 072M4750V) se disolvieron en DMSO (Sigma).

Línea celular	Vendedor	#de Cat	Descripción
50 PC-3	ATCC	CRL-1435	próstata, adenocarcinoma
22RV1	SIBS	TCHu 100	próstata, carcinoma
DU145	ATCC	HTB-81	próstata, carcinoma
55 LNCaP Clon FGC	ATCC	CRL-1740	próstata, carcinoma
AGS	ATCC	CRL-1739	estómago, adenocarcinoma gástrico
MKN-45	JCRB	JCRB0254	estómago, adenocarcinoma gástrico
Hs746T	ATCC	HTB-135	estómago, carcinoma gástrico
60 NCI-N87	ATCC	CRL-5822	estómago, carcinoma gástrico
MCF7	ATCC	HTB-22	mama, adenocarcinoma (derrame pleural)
BT-474	ATCC	HTB-20	mama, carcinoma ductal
65 ZR-75-1	ATCC	CRL-1500	mama, carcinoma ductal

	Línea celular	Medio Completo	Densidad de siembra (96 pocillos, por pocillo)	Tiempo de incubación (hr)
5	PC-3	F-12K+FBS10%	3000	72
10	22RV1	RPMI1640+FBS10%	6000	72
	DU145	DMEM+FBS 10%	5000	72
	LNCaP Clon FGC	RPMI1640+FBS10%	5000	72
15	AGS	F-12K+FBS10%	2500	48
	MKN-45	RPMI1640+FBS10%	2500	72
	Hs746T	DMEM+FBS10%	2000	72
20	NCI-N87	RPMI1640+FBS10%	4000	72
	MCF7	Medio esencial mínimo de Eagle+insulina bovina 0,01 mg/mL+ FBS10%	4000	72
25	BT-474	Hybricare + FBS10%	12000	72
	ZR-75-1	RPMI1640+FBS10%	3000	72

30 Ensayo de proliferación celular: El ensayo MTT se usó para determinar la supresión del crecimiento de células de  
 35 cáncer de próstata por lestaurtinib. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con 60% de confluencia, y se  
 incubaron con DMSO 0,1% (control), lestaurtinib 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 nM durante 48 horas antes del ensayo  
 de MTT. Cada concentración de lestaurtinib se repitió al menos 3 veces para minimizar la variación. El reactivo MTT  
 (reactivo de solución acuosa CellTiter 96® por Promega™) se mezcló con el medio DMEM, y se pipetearon 100 µl de  
 la mezcla en cada pocillo. El color del medio cambió de amarillo/marrón a marrón oscuro, lo que indica que el MTS  
 tetrazolio se convirtió en formazán. Después se cuantificó el formazán mediante un lector de placas SpectraMax M5.  
 Además se obtuvo un pocillo blanco con mezcla de MTT solo para la sustracción de fondo.

40 Análisis de proteínas en los lisados celulares: Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el método  
 colorimétrico con el uso de reactivos de análisis de proteínas BioRad. En resumen, se mezclaron 2 µL de lisados  
 celulares con 1 mL de reactivo diluido 1:5 y se determinó la OD595 mediante el espectrofotómetro SmartSpec 3000™  
 (Bio-Rad). Se analizaron cantidades iguales de proteínas con SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con  
 dodecil sulfato de sodio) con el uso de 4-20% Criterion™ TGX™ Precast Gels. Se añadieron estándares de proteínas  
 preteñidas para la migración conjunta con muestras para estimar los pesos moleculares. Una vez que se completó la  
 45 electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a la membrana de nitrocelulosa para la transferencia de membrana  
 de tipo Western. Se usó Ponceau S para teñir las proteínas. La membrana se incubó primero con leche al 5% en TBST  
 (solución salina tamponada con Tween 20) para bloquear la unión no específica durante 1 hora, seguido de una  
 incubación con el anticuerpo primario (dilución 1:1000) durante toda la noche. Después de lavar la membrana 3 veces  
 con TBST durante 30 minutos, se añadió anticuerpo secundario anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano  
 50 picante para la incubación durante otros 60 minutos. Se usaron películas de quimioluminiscencia y rayos X para  
 detectar las bandas. El anticuerpo policlonal de conejo (5E11) contra SRC-3 se adquirió de Cell Signaling Technology  
 (Boston, MA). El anticuerpo policlonal de conejo contra PRK1 (07-557) fue de Upstate/Millipore (Billerica, MA).

55 Fraccionamiento Subcelular: El fraccionamiento subcelular se realizó para separar los núcleos y el citoplasma de las  
 células. Las células PC3, DU145 y LNCaP se incubaron con DMSO al 0,1% (control) o lestaurtinib 1 µM durante 6  
 horas antes de la recolección para el fraccionamiento subcelular. Se añadió a las células un tampón de lisis hipotónico  
 que contenía EDTA 1 mM (ácido etilendiamino tetraacético), PBS 0,1x (solución salina tamponada con fosfato), y una  
 batería de inhibidor de proteasoma durante 5 min. Las células se rasparon y se rompieron cortando 25 veces con  
 60 agujas 27G en jeringas de tuberculina. Los núcleos se sedimentaron primero con una centrifugación a 3.000 rpm a  
 4°C durante 10 minutos, y después los sobrenadantes se centrifugaron a 15.000 rpm a 4°C durante 10 minutos y los  
 sobrenadantes se usaron como citoplasma. Los lisados celulares completos, las fracciones nucleares y las fracciones  
 citoplásmicas se usaron para el análisis de proteínas y la transferencia de membrana de tipo Western. Se usaron  
 anticuerpos contra tubulina, actina e histona para los controles de la carga y localización.

65 Ejemplo 2: Búsqueda de sustratos de la SPOP

La búsqueda en PubMed de la degradación de la proteína dependiente de la SPOP reveló que SRC-3, Daxx y Gli son los sustratos conocidos de la SPOP (J Biol Chem. 2006; 281:12664-72, Oncogene 2011; 30: 4350-64, Dev Cell. 2006; 10: 719-29). Se realizaron búsquedas en la base de datos NCBI con un intento de identificar otros sustratos de la SPOP que se implican en la señalización del receptor de andrógenos. La base de datos estructural en el NCBI reveló que tres secuencias peptídicas pueden interactuar con la SPOP. Éstas incluyen:

KAASADSTTEGTPAD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=77512>)

NTLFPDVSSSTH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=77549>)

DEVTSTTSSS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=77550>)

Las tres secuencias peptídicas son consistentes con la secuencia de consenso de Ser/Thr múltiple seguida de un residuo ácido previamente reportado (Proc Natl Acad Sci US A. 2009; 106: 21191-6). Realizamos una búsqueda BLAST con el uso de las secuencias de consenso para identificar otras proteínas con la secuencia de consenso, que podrían ser sustratos de la SPOP potenciales que no fueron reconocidos en el pasado. Una búsqueda BLAST con DSTSS resultó en una serie de correlaciones. Cuatro correlaciones ejemplares se listan más abajo.

gi|339276078|ref|NP\_001229847.1| Isoforma c de la proteína 6 del dedo de zinc tipo AN1 [Homo sapiens]

MAQETNHSQVPMCLCSTGCGFYGNPRTNGMCSVCYKEHLQRQNSSNGRISPPATSVSSLSESLPVQCTDGSVPEAQ  
SALDSTSSMQPSPVSNQSLLESVASSQLDSTSVDKAVPETEDVQGFECRCGNVYCGVHRYSDVHNCSESYNYKADA  
AEKIRKENPVVVGEKIQKI

gi|62739157|ref|NP\_001014988.1| enlazador para la activación de la isoforma c del miembro 1 de la familia de células T [Homo sapiens]

MEEAILVPCVLGLLLLPILAMLMLALCVHCHRLPGSYDSTSSDSLYPRGIQFKRPHTVAPWPPAYPPVTSYPPLSQPDLL  
PIPSPQPLGGSHRTPSSRRDSDGANSVASVYENEEPACEDADEDEDDYHNPGLVLPDSTPATSTAAPSAPALSTPG  
IRDSAFSMESIDYVNVPESGESAEASLDGSREYVNVSQELHPGAAKTEPAALSSQEAEEVEEEGAPDYENLQELN

gi|121114298|ref|NP\_003579.3| isoforma 1 de cullin-4B [Homo sapiens]

MMSQSSGSGDGNDEATTSKDGGFSSPSPSAAAAAQEVRSATDGNTSTTPPTSAKKRKLNSSSSSSSSSSSNERED  
FDSTSSSSTPPLQPRDSASPSTSSFCGLGVSAASSHVPIQKLRFEFTLEFVGFDAKMAEESSSSSSSSPTAATSQ  
QQQLKNKSILISSVASVHHANGLAKSSSTTVSSFANSKPGSAAKLVIKNFKDKPKLPENYTDWQKLKEAVEAIQNSTSI  
KYNLEELYQAVENLCSYKISANLYKQLRQICEDHIKAQIHQFREDLSL

gi|41872646|ref|NP\_055595.2| isoforma 2 de cullin-7 [Homo sapiens]

WEKVEVSSNPHRASKLTDHNPKYWESNGSAGSHYITLHMRRGILIRQLTLLVASEDSSYMPARVVVCGGDSTSSLH  
TELNSVNVMPASRVILLENLTRFWPIIQIRIKRCQGGIDTRIRGLEILGPKPTFWPVFREQLCRHTRLFYMVRAQAWS  
QDMAEDRRSLLHLSSRLNGALRQEQNFAADRFLPDDEAAQALGKTCWEALVSPV

Otra búsqueda BLAST por una secuencia DSSTT identificó DEK (secuencia de referencia NCBI: NP\_003463.1)

>gi|4503249|ref|NP\_003463.1| isoforma 1 de la proteína DEK [Homo sapiens]

MSASAPAAEGEGTPTQPASEKEPEMPGPREEESSEEEDEDEEEEEEEKEKSLIVEGKREKKKVERLTMQVSSLQRE  
PFTIAQKGQKLCEIERIHFFLSKKTDELRLNHLKLLYNRPGTVSSLKKNVGFSGFPEKGSVQYKKEEMLKKFRN  
AMLKSICEVLDLERSGVNSELVKRILNFLMHPKPSGKPLPKSKKTCGKSKKERNSSGMARKAKRTKCEILSDESSS  
DEDEKKNKEESSDDEDKESSEPPKKTAKREPKQKATSKSKSVKSANVKKADSSTTKKNQNSSKKESESEDSSD  
DEPLIKLKKPPTDEELKETIKLLASANLEEVMTKQICKKVYENPTYDLTERKDFIKTTVKELIS

Ejemplo 3: Sensibilidad de células de cáncer de próstata, mama y gástricas contra Lestaurtinib

Para examinar la factibilidad del uso de lestaurtinib para tratar los cánceres de próstata, mama, gástrico y otros, tres líneas celulares de cáncer de próstata con grados variables de sensibilidad a los andrógenos, PC3 (insensibilidad a los andrógenos), DU145 (insensibilidad a los andrógenos) y LNCaP (sensibilidad a los andrógenos), se investigaron en su sensibilidad contra lestaurtinib (Figura 2). Tres líneas celulares de cáncer de mama, MCF7, BT-474 y ZR-75-1 (Figura 3), y cuatro líneas celulares de cáncer gástrico, AGS, MKN-45, Hs746T y NCI-N87 (Figura 4), además se probaron para determinar su IC<sub>50</sub> contra lestaurtinib y en comparación con estaurosporina, un homólogo de lestaurtinib con actividad inhibitoria de quinasa mucho más amplia. Todas las células tumorales se trataron con DMSO (control) o 10, 30, 100, 300, 1000 o 3000 nM de lestaurtinib o estaurosporina durante 48 horas. Ensayos de MTT se realizaron después para determinar el impacto de tratamiento del fármaco en la viabilidad de las células tumorales. La IC<sub>50</sub> se determinó como la concentración de lestaurtinib que logró la mitad de la máxima disminución en la viabilidad celular.

Como se muestra en la Figura 2-4, lestaurtinib fue efectivo para reducir la viabilidad de las células de cáncer de próstata y gástrico, mientras que las células de cáncer de mama fueron más resistentes contra lestaurtinib con mayor IC<sub>50</sub>. La IC<sub>50</sub> para cada línea celular tumoral se resume en la TABLA 1.

#### 5 Ejemplo 4: Niveles de expresión de las proteínas SRC-3 y PRK1 en células de cáncer de próstata

Con el uso de la transferencia de membrana de tipo Western, los niveles de expresión de la proteína SRC-3 se examinaron en las tres líneas celulares de cáncer de próstata antes y después del tratamiento con lestaurtinib. Las células LNCaP, DU145 y PC3 se trataron con lestaurtinib 1 µM durante 6 horas y se recogieron para el fraccionamiento subcelular. Los lisados celulares completos, las fracciones nucleares y las fracciones citosólicas se analizaron con transferencia de membrana de tipo Western con el uso de diversos anticuerpos. Se usaron actina, tubulina e Histona-H3 como controles de la carga y localización.

Las células LNCaP, PC3 y DU145 no tratadas exhibieron niveles similares de expresión de la proteína SRC-3 (Figura 5, panel superior). Sin embargo, las células LNCaP tratadas con lestaurtinib exhibieron una profunda disminución de SRC-3, mientras que los niveles de proteína SRC-3 en las células PC3 y DU145 tratadas con lestaurtinib no se alteraron significativamente (Figura 5, panel superior). Por el contrario, los niveles de expresión de la proteína PRK1 no se alteraron significativamente con el tratamiento con lestaurtinib en ninguna de las líneas celulares probadas.

#### 20 Ejemplo 5: Cambios de las proteínas SRC-3 y PRK1 en el núcleo y el citoplasma

El efecto del tratamiento con lestaurtinib en la localización intracelular de SRC-3 y PRK se investigó en las tres líneas celulares de cáncer de próstata con el uso de estudios de fraccionamiento subcelular. Las líneas celulares LNCaP, PC3 y DU145 se trataron con lestaurtinib 1000 nM o vehículo de control durante 6 horas. Las fracciones nucleares y citosólicas se obtuvieron y analizaron por membrana de Western. Los anticuerpos usados incluyen SRC-3, PRK, tubulina, histona-H3, y actina. El análisis por membrana de Western reveló que el tratamiento con lestaurtinib redujo la proteína SRC-3 en el citoplasma de las tres líneas celulares. La reducción en el SRC-3 citoplasmático fue mucho más dramática en las células LNCaP tratadas con lestaurtinib en comparación con las células PC3 o DU145 tratadas con lestaurtinib (Figura 5, panel inferior). El tratamiento con lestaurtinib no causó una reducción en los niveles de proteína nuclear SRC-3 en las células LNCaP, DU145 o PC3 (Figura 5, panel inferior). Por el contrario, los niveles de proteína PRK-1 nuclear aumentaron por el tratamiento con lestaurtinib en las tres líneas celulares, mientras que los niveles de PRK-1 citoplasmático no se modificaron con el tratamiento con lestaurtinib (Figura 5, panel inferior).

Sobre la base de los datos anteriores, se propuso un modelo (Figura 6). En las células con niveles normales de actividad de la SPOP, los sustratos de la SPOP tales como Gli, SRC-3 y AWP1 pueden degradarse a través de la degradación de la proteína dependiente de la SPOP, que regula la actividad de AR (panel izquierdo, Figura 6). Sin embargo, en las células de cáncer de próstata con actividad reducida de la SPOP (tal como, por ejemplo, células de cáncer de próstata con SPOP mutada), la degradación de los sustratos de la SPOP tales como SRC-3, Gli, AWP1, por SPOP se deteriora, lo que resulta en la acumulación de los sustratos de la SPOP y AR mejorada y/o actividad de la ruta de prosupervivencia. Se encontró que la muerte celular mediada por lestaurtinib de células de cáncer de próstata dependientes de andrógenos se correlaciona con una reducción significativa de los niveles de SRC3, un sustrato de SPOP que actúa como un coactivador del receptor de andrógenos. Estos datos indican que el lestaurtinib puede usarse para tratar eficazmente enfermedades en los sujetos que tienen niveles aberrantemente altos de sustrato de SPOP o actividad de la ruta del sustrato, tal como en sujetos que tienen mutaciones de la SPOP y/o niveles altos de SRC3. Este mecanismo proporciona un enfoque basado en la racionalidad para interrumpir la activación del receptor de andrógenos mediante el bloqueo del proceso.

#### Ejemplo 6: Cambios en los niveles de proteína SRC3 y DEK en células de cáncer de próstata, mama y gástrico.

En base a su sensibilidad contra lestaurtinib, se seleccionaron células de cáncer de próstata LNCaP y PC3, células de cáncer de mama MCF7 y ZR75-1, y células de cáncer gástrico MKN-45 y NCI-N87 para probar los niveles de expresión antes y 24 horas después de tratarse con dos diferentes dosis de lestaurtinib. Las dosis que alcanzaron aproximadamente el 40% y el 70% de inhibición del crecimiento se seleccionaron para el tratamiento y se examinaron por transferencia de membrana de tipo Western. Para el cáncer de próstata mostrado en la Figura 7, los niveles de proteína SRC3 disminuyeron en las células tratadas con dosis más altas, pero no se observaron cambios obvios en los niveles de proteína DEK. Para el cáncer de mama mostrado en la Figura 8, MCF7 tuvo los niveles más altos de SRC3 en la línea de base y mostró la disminución más profunda dependiente de la dosis después del tratamiento con lestaurtinib. ZR75-1 tuvo niveles mucho más bajos de SRC3, pero ningún cambio evidente después del tratamiento. Sin embargo, tanto las células MCF7 como las ZR75-1 tuvieron niveles reducidos de proteína DEK después del tratamiento. En el cáncer gástrico mostrado en la Figura 9, los niveles de expresión de SRC3 mostraron una disminución en las células MKN-45 después del tratamiento con una dosis más alta de lestaurtinib, pero no en NCI-N87. Los niveles de DEK no cambiaron después del tratamiento con lestaurtinib como se muestra en la Figura 9.

Aunque las modalidades preferidas de la presente invención se demostraron y describieron en la presente, será obvio para aquellos con experiencia en la técnica que tales modalidades se proporcionan sólo a modo de ejemplo. Numerosas variaciones, cambios y sustituciones ocurrirán ahora por aquellos con experiencia en la técnica sin

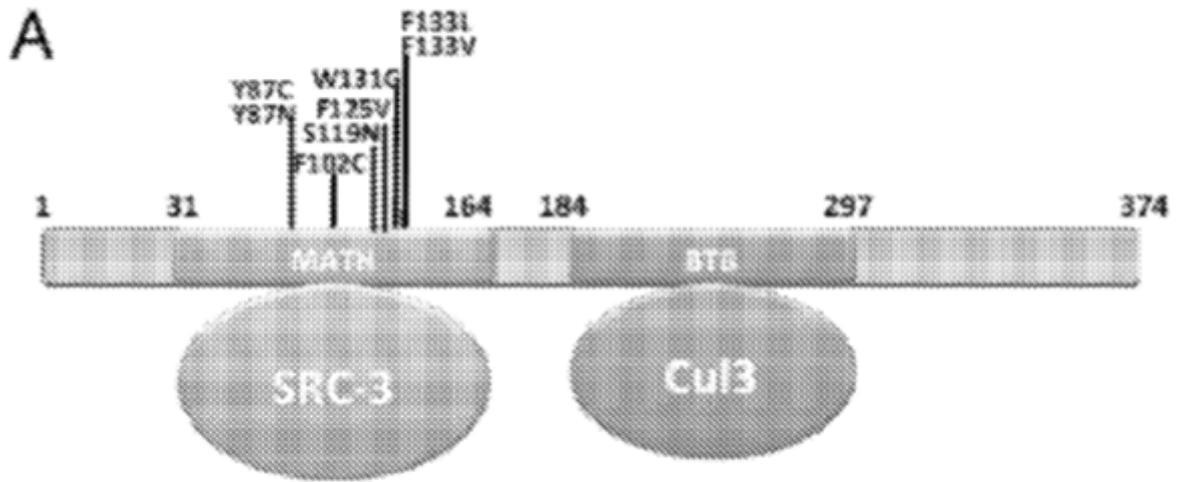
apartarse de la invención. Se debe entender que diversas alternativas a las modalidades de la invención descritas en la presente invención pueden emplearse en la práctica de la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que de ese modo sean cubiertos los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones.

5

## REIVINDICACIONES

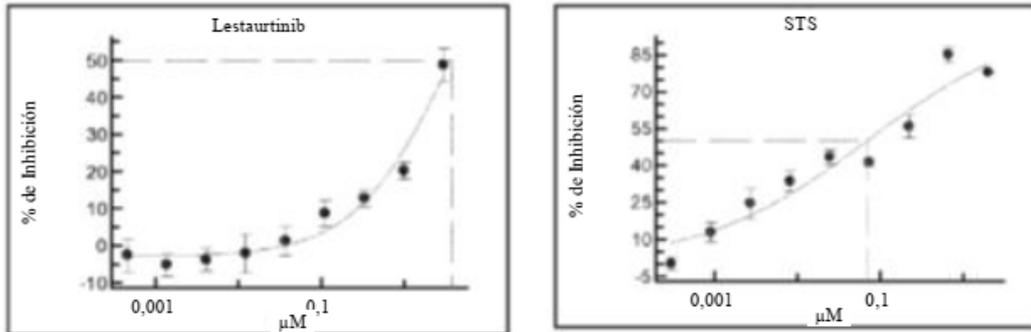
1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de un tumor de próstata, un tumor de mama, o un tumor gástrico en un sujeto mediante regulación negativa de una señalización de sustrato de la proteína POZ de tipo moteado (SPOP), cuyo uso comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica, regulando de ese modo negativamente la señalización del sustrato de SPOP en el sujeto, en donde el sujeto exhibe un nivel aberrantemente alto de un sustrato de SPOP o actividad de sustrato de SPOP en comparación con un sujeto de control.
2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sustrato de SPOP se selecciona del grupo que consiste en SRC1, SRC2, SRC3, Daxx, Gli, AWP-1, cullin-4B, cullin-7 y DEK.
3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la regulación negativa comprende disminuir un nivel y/o actividad del sustrato de SPOP o un objetivo corriente abajo del sustrato que incluye PRK-1.
4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el nivel comprende un nivel de expresión, que incluye un nivel de expresión de la proteína, un nivel de una transcripción del sustrato de SPOP, o un nivel del sustrato en una fracción citoplásmica de la célula.
5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición es para su uso en el tratamiento del tumor de mama o el tumor gástrico.
6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición es para su uso en el tratamiento de un tumor de próstata, un tumor de mama o un tumor gástrico en el sujeto que lo necesita, que comprende:
  - (a) administrar al sujeto una primera dosis de la composición farmacéutica;
  - (b) determinar un nivel de sustrato de SPOP o su actividad en una muestra biológica derivada del sujeto; y
  - (c) administrar una dosis adicional de la composición farmacéutica si el nivel de sustrato o su actividad se reduce en comparación con un sujeto de control que no se le administra una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lestaurtinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el nivel aberrantemente alto se evidencia por la presencia de una mutación SPOP en el tumor.
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la mutación incluye una secuencia de aminoácidos alterada entre las posiciones 31-161 de la secuencia de aminoácidos de la SPOP o una sustitución de aminoácido en Y87, F102, S119, F125, K129, W131, F133, y/o K134 de la secuencia de aminoácidos de la SPOP.
9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tumor es sensible a andrógenos, insensible a andrógenos, sensible a estrógenos, o insensible a estrógenos.
10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición es para su uso en la regulación negativa de un nivel de sustrato de SPOP o su actividad en una célula de próstata en el sujeto, que comprende:
  - (a) administrar a la célula una cantidad eficaz de lestaurtinib, que de ese modo regula negativamente el sustrato SPOP o su actividad en la célula; y
  - (b) evaluar la regulación negativa del nivel de sustrato de SPOP o su actividad en la célula de la próstata.
11. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la célula de próstata es una célula de cáncer de próstata o una célula de próstata sensible a andrógenos.
12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición es para su uso en la regulación negativa de un nivel de sustrato de SPOP o su actividad en una célula mamaria o gástrica en el sujeto, que comprende:
  - (a) administrar a la célula una cantidad eficaz de lestaurtinib, que de ese modo regula negativamente el sustrato SPOP o su actividad en la célula; y
  - (b) evaluar la regulación negativa del nivel de sustrato de SPOP o su actividad en la célula mamaria o gástrica.
13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la célula mamaria o gástrica es una célula sensible a andrógenos o una célula sensible a estrógenos.

14. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sujeto es un humano.

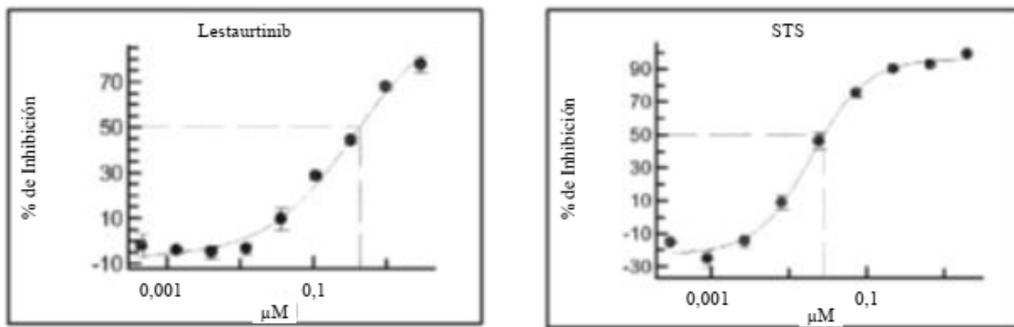


**Figura 1**

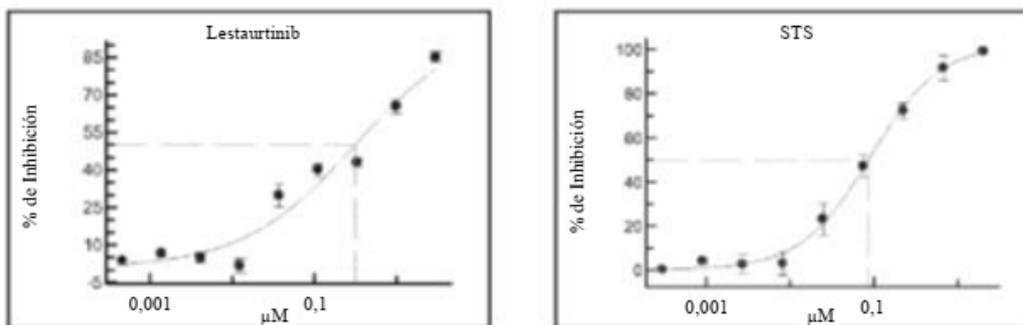
**2A. PC3** ( $IC_{50} > 3 \mu M$  para lestaurtinib,  $IC_{50} = 0,07 \mu M$  para estaurosporina (STS))



**2B. 22RV1** ( $IC_{50} = 0,36 \mu M$  para lestaurtinib,  $IC_{50} = 0,02 \mu M$  para estaurosporina (STS))

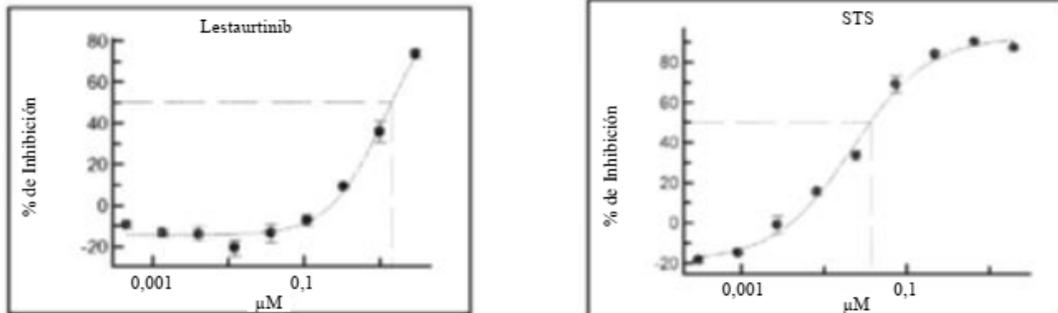


**2C. LNCaP Clon FGC:** ( $IC_{50} = 0,32 \mu M$  para lestaurtinib,  $IC_{50} = 0,09 \mu M$  para estaurosporina (STS))

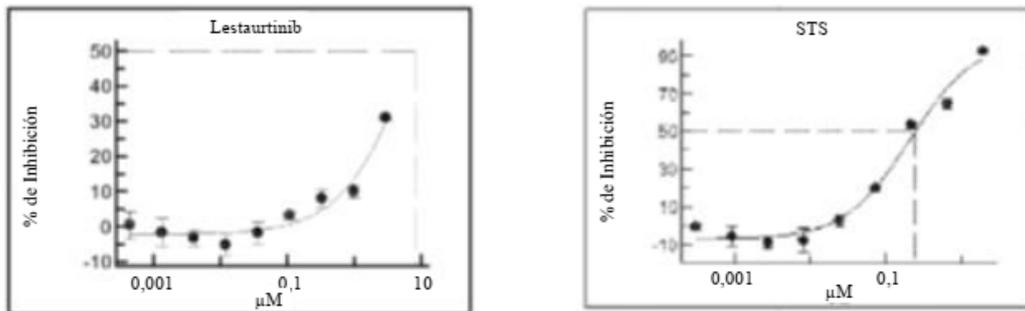


**Figura 2**

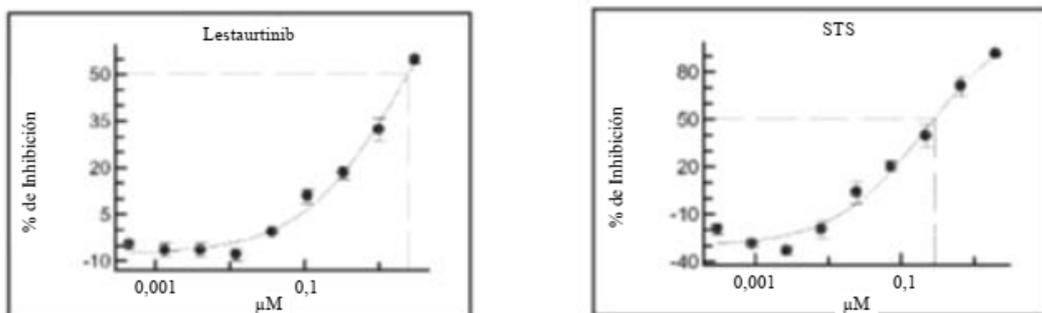
**3A. MCF7** ( $IC_{50}$ = 1,15  $\mu$ M para lestaurtinib,  $IC_{50}$ = 0,02  $\mu$ M para estaurosporina (STS))



**3B. BT-474** ( $IC_{50}$  > 3  $\mu$ M para lestaurtinib,  $IC_{50}$ = 0,21  $\mu$ M para estaurosporina (STS))

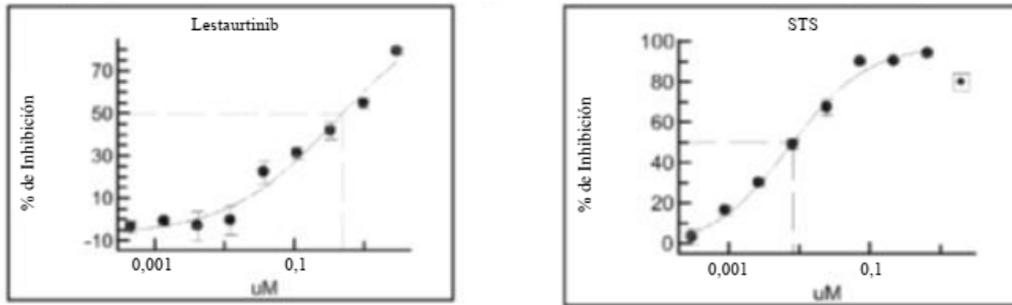


**3C. ZR-75-1** ( $IC_{50}$  = 1,95  $\mu$ M para lestaurtinib,  $IC_{50}$ = 0,22  $\mu$ M para estaurosporina (STS))

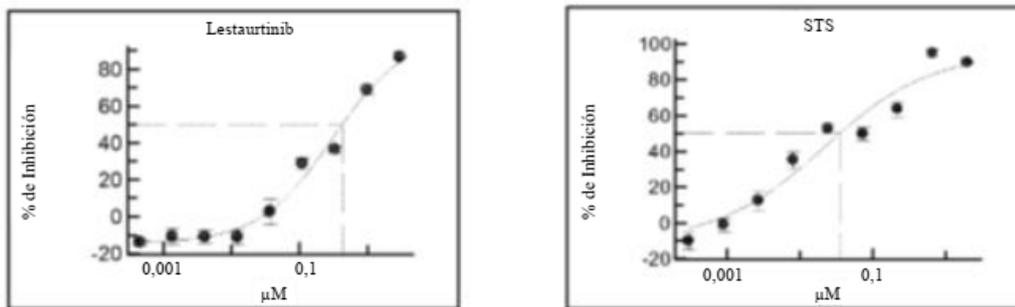


**Figura 3**

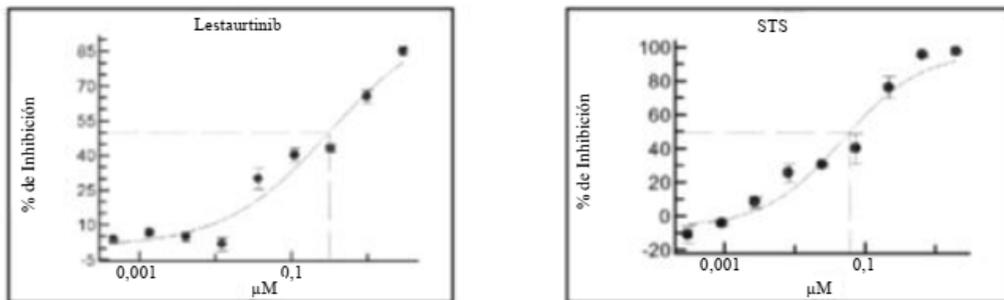
**4A. AGS** ( $IC_{50} = 0,39 \mu M$  para lestaurinib,  $IC_{50} = 0,01 \mu M$  para estaurosporina (STS))



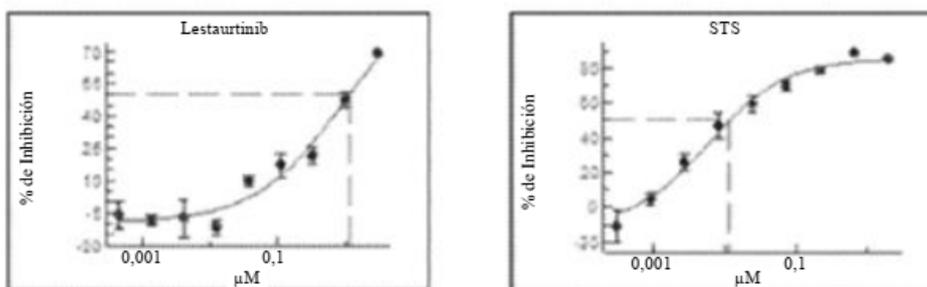
**4B. MKN-45** ( $IC_{50} = 0,31 \mu M$  para lestaurinib,  $IC_{50} = 0,02 \mu M$  para estaurosporina (STS))



**4C. Hs746T** ( $IC_{50} = 0,87 \mu M$  para lestaurinib,  $IC_{50} = 0,05 \mu M$  para estaurosporina (STS))



**4D. NCI-N87** ( $IC_{50} = 0,88 \mu M$  para lestaurinib,  $IC_{50} = 0,01 \mu M$  para estaurosporina (STS))

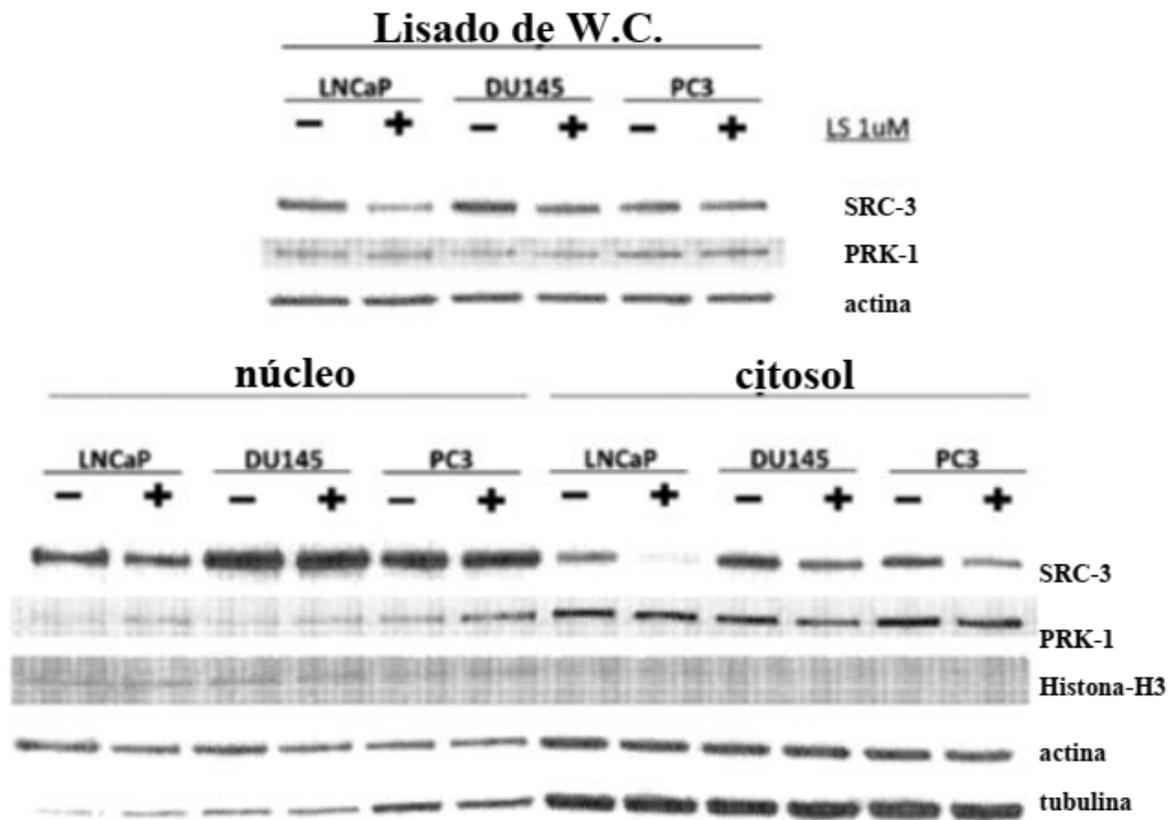


**Figura 4**

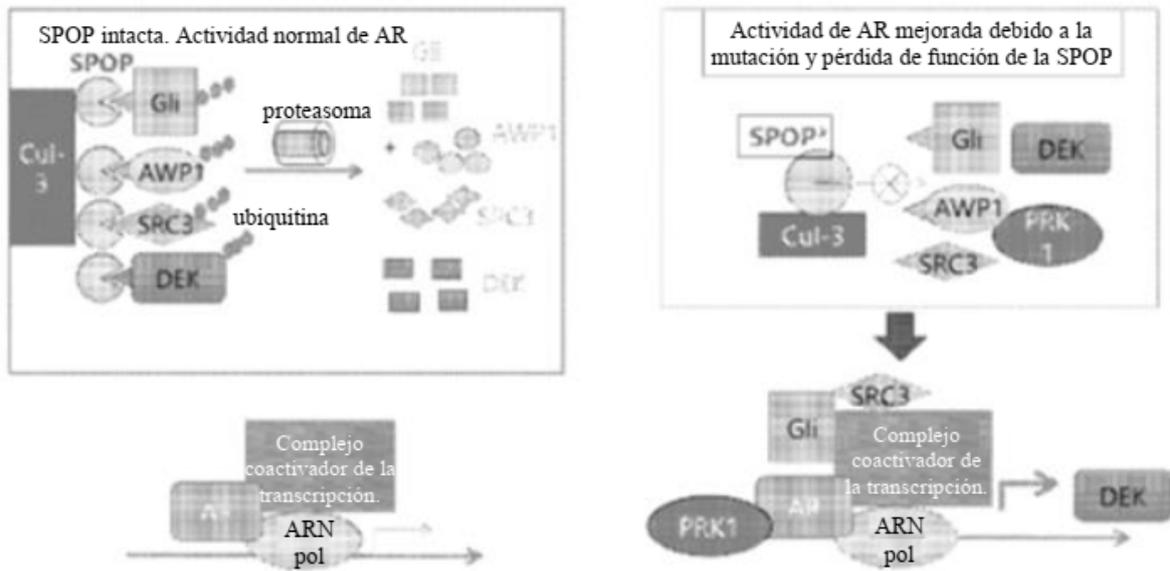
**Resumen de los resultados de IC<sub>50</sub> para todas las líneas celulares probadas**

	Células	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
		Lestaurtinib	Estaurosporina
Células de cáncer de próstata	PC-3	>3,0	0,07
	22RV1	0,36	0,02
	LNCaP Clon FGC	0,32	0,09
Células de cáncer de mama	MCF7	1,15	0,02
	BT-474	>3,0	0,21
	ZR-75-1	1,95	0,22
Cáncer gástrico	AGS	0,39	0,01
	MKN-45	0,31	0,02
	Hs746T	0,87	0,05
	NCI-N87	0,88	0,01

**TABLA 1**



**Figura 5**



**Figura 6**

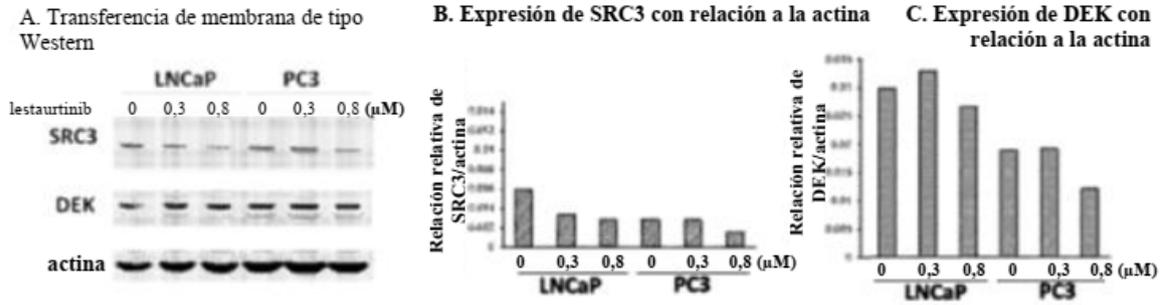


Figura 7



Figura 8

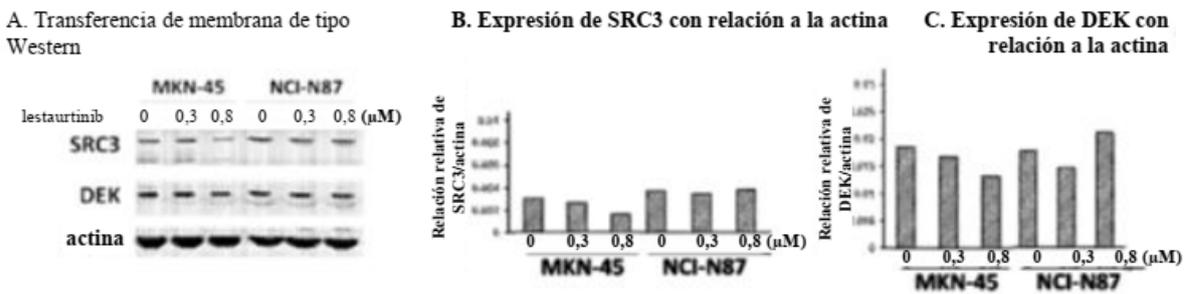


Figura 9

Acceso al Genbank CAA04199:

MSRVSPPPPAEMSSGPVAESWCYTQIKVVKFSYMWTINNFSFCREEMGEVIKSSSTFS  
SG  
ANDKCLKWCLRVNPKGLDEESKDYLSTLYLLLVSCPKEVRAKFKFSILNAKGEETKA  
MESQ  
RAYRFVQGGKDWGFKKFIRRDFLLEANGLLPDDKLTLCFCEVSVVQDSVNISGQNTM  
NMVK  
VPECRLADELGGLWENSRFTDCCLCVAGQEFQAHKAILAARSPVFSAMFEHEMEEES  
KKNR  
VEINDVEPEVFKEMMCFIYTGKAPNLDKMADDLLAAADKYALERLKVMCEDALCS  
NLSVE  
NAAEILILADLHSADQLKTQAVDFINYHASDVLETSGWKSMVVSHPHLVAEAYRSL  
ASAQ  
CPFLGPPRKRLKQS

**Figura 10**