



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 843**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 407/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05710143 .8**

96 Fecha de presentación : **04.02.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1712642**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **Procedimiento para examinar la sensibilidad de células cancerosas a un agente anticanceroso.**

30 Prioridad: **06.02.2004 JP 2004-30106**
11.03.2004 JP 2004-69384

73 Titular/es: **Eisai R&D Management Co., Ltd.**
6-10, Koishikawa 4-chome
Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, JP
MERCIAN CORPORATION

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.08.2010

72 Inventor/es: **Uenaka, Toshimitsu y**
Iwata, Masao

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.08.2010

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

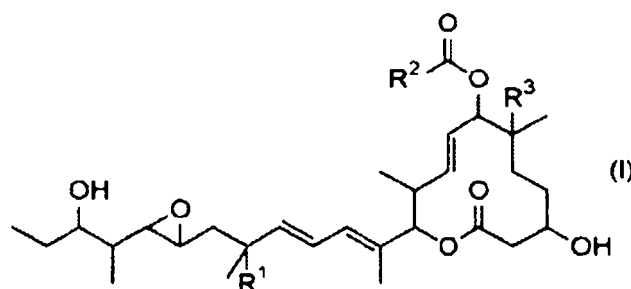
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Procedimiento para examinar la sensibilidad de células cancerosas a un agente anticanceroso.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para predecir la sensibilidad de una célula cancerosa a un compuesto útil como fármaco anticanceroso representado por la fórmula (I) (que se denomina en lo sucesivo presente compuesto).

25 **Técnica antecedente**

La quimioterapia del cáncer se ha realizado convencionalmente con fármacos anticancerosos, que han resultado ser eficaces sobre cada tipo de cáncer de órgano, solos o en combinación con otros fármacos. Además, en tipos de cánceres específicos, se han establecido terapias convencionales por medio de ensayos aleatorios controlados a gran escala que se han hecho populares en los últimos años. Sin embargo, estas terapias han conseguido porcentajes de respuesta, en general, sólo del 20-50%. Aunque más de la mitad de los pacientes no pueden tener efectos terapéuticos, en la presente situación se usa quimioterapia asociada con el riesgo de reacciones adversas (JACR Monograph N° 7, 10-19, 2002).

Con la intención de clasificar a los pacientes dependiendo de la eficacia de los fármacos anticancerosos, convencionalmente se han intentado procedimientos de “ensayos de sensibilidad a fármacos”. Los ensayos para determinar la sensibilidad a fármacos anticancerosos incluyen el ensayo SDI (Jpn J Cancer Res. 85: 762-765, 1994), CD-DST (Jpn J Cancer Res. 92: 203-210, 2001), HDRA (Clin Cancer Res. 1: 305-311, 1995) o similares, y todos estos procedimientos tienen procedimientos comunes en los que se recoge una muestra de célula cancerosa y se expone a un fármaco anticanceroso para evaluar la sensibilidad al fármaco anticanceroso. Sin embargo, estos procedimientos tienen los problemas de que las células cancerosas deben mantenerse vivas en un tubo de ensayo, los resultados de ensayo y los efectos clínicos no necesariamente concuerdan, o similares, y por lo tanto su velocidad de ejecución se mantiene aproximadamente en un 0,5% (summary math of questionnaire by Japan Research Society for Appropriate Cancer Chemotherapy, 1996).

En relación con fármacos de dirección molecular que se dirigen a moléculas específicas de las células cancerosas, se ha presentado un caso en el que la sensibilidad a un fármaco se predice satisfactoriamente por medio de un diagnóstico molecular tal como el ensayo de Herceptina (Clin Cancer Res. 7: 1669-1675, 2001). Sin embargo, en relación con otros fármacos, no puede predecirse la sensibilidad por una sola molécula diana, lo que sugiere que con frecuencia la sensibilidad se especifica por una pluralidad de moléculas (Nat Genet. 24: 236-244, 2000). La tecnología de micromatriz de ADNc desarrollada recientemente permitió el análisis de expresión de genes en una cantidad extremadamente grande y, por lo tanto, un análisis exhaustivo de factores que especifican la sensibilidad. Por ejemplo, los efectos terapéuticos de Gleevec, un fármaco para tratar la leucemia mielógena crónica, pueden predecirse mediante el análisis de expresión de los 15 a 30 agrupamientos génicos que se han propuesto por el resultado del análisis de micromatriz de ADNc (Jpn J Cancer Res. 93: 849-56, 2002).

El desarrollo futuro de un fármaco anticanceroso usado en la quimioterapia para el cáncer debe tener como objetivo proporcionar una combinación con un procedimiento de diagnóstico para evaluar la sensibilidad al fármaco antes del tratamiento, y por lo tanto es importante encontrar una molécula para el diagnóstico molecular que permita predecir la sensibilidad al fármaco que se va a desarrollar.

Divulgación de la invención

En el Journal of Antibiotics, Japan Antibiotics Research Association, Tokio JP, vol. 47, 1994, 1395-1401, se han presentado actividades citocidas del macrólido FD-895, que es un derivado del presente compuesto, contra diversas líneas de células cancerosas cultivadas.

El presente inventor descubrió, en los documentos WO 02/060890, WO 03/099813 y WO 04/011661, que el presente compuesto expresaba una actividad antitumoral extremadamente potente contra la línea de células cancerosas de mama humana (BSY-1), y también contra la línea de células cancerosas de colon humano (WiDr).

Por otra parte, se descubrió que el presente compuesto era menos eficaz para la línea celular de cáncer microcítico de pulmón (Calu-1) en comparación con las cepas de células cancerosas anteriores, lo que demuestra que la actividad antitumoral del presente compuesto dependía de las células cancerosas.

Si se demuestra que ciertas moléculas están asociadas con la sensibilidad de las células cancerosas al presente compuesto, y pueden examinarse células cancerosas extraídas de un paciente con cáncer por biopsia o similar con respecto a la expresión de estas moléculas, entonces el presente compuesto puede administrarse selectivamente sólo a los pacientes con cáncer que es de esperar que se beneficien de la actividad antitumoral del presente compuesto y por lo tanto es de esperar que el efecto terapéutico mejorado reduzca efectos adversos innecesarios.

En la investigación de las características moleculares de la cepa BSY-1 que tiene una alta sensibilidad al presente compuesto, los presentes inventores se centraron en moléculas que controlan la transición G1/S en el ciclo celular que se ha propuesto que está alterada en cánceres de mama y de pulmón. Se examinaron cuatro moléculas, incluyendo p16 y pRB que son genes supresores de tumores, y la ciclina D1 y la ciclina E que compiten con ellos o los controlan negativamente, con respecto a sus niveles respectivos de expresión de proteína. Como resultado, BSY-1 mostró las características moleculares de una expresión reducida de pRB, la expresión positiva de p16 y un alto nivel de expresión de la ciclina E.

Se examinaron 25 líneas de células cancerosas humanas incluyendo BSY-1, WiDr y Calu-1 para clarificar sus respectivas características con respecto a la expresión reducida o la mutación de pRB (denominado en lo sucesivo bajo nivel de expresión de pRB), la expresión positiva de p16 o un alto nivel de expresión de la ciclina E. Mientras tanto, se usaron ratones en los que se implantaron estas células cancerosas para medir la actividad antitumoral del presente compuesto sobre ellas. Muchas de las líneas de células cancerosas humanas que tenían al menos una de estas características presentaron alta sensibilidad al presente compuesto, mientras que la mayoría de las líneas de células cancerosas que carecían de estas características eran menos sensibles.

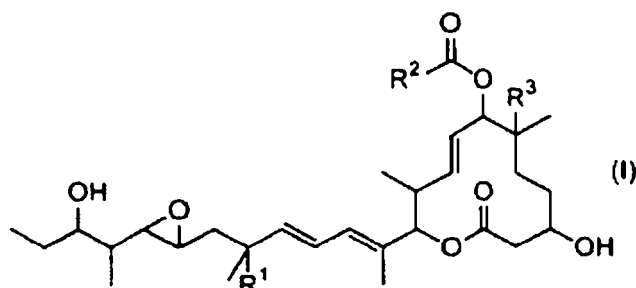
A ratones en los que se implantaron siete cepas con características de bajo nivel de expresión de pRB y alto nivel de expresión de ciclina E y a ratones en los que se implantaron seis cepas con características de expresión positiva de p16 y alto nivel de expresión de ciclina E se les administró el presente compuesto. Como resultado, cuatro de estas cepas mostraron una eliminación especialmente completa de tumores, y una cepa mostró una reducción sostenida a largo plazo de tumores, aunque no una eliminación completa.

Se ha descubierto que en una célula cancerosa pueden examinarse sus características con respecto al bajo nivel de expresión de pRB, la expresión positiva de p16 o un alto nivel de expresión de ciclina E para predecir la sensibilidad de la célula cancerosa al presente compuesto. El descubrimiento completó la presente invención.

Concretamente, la presente invención se refiere a los siguientes.

1. Un procedimiento de ensayo para predecir la sensibilidad de una célula cancerosa a un compuesto representado por la siguiente fórmula I, que comprende usar un índice cualquiera de:

- 1) se reduce la expresión de pRB;
- 2) se expresa p16;
- 3) se potencia la expresión de la ciclina E;
- 4) se reduce la expresión de pRB y se potencia la expresión de la ciclina E; o
- 5) se expresa p16 y se potencia la expresión de la ciclina E: Fórmula (I)



ES 2 343 843 T3

(en la que, R^1 representa

(1) un átomo de hidrógeno o

(2) un grupo hidroxilo;

R^3 representa

(1) un átomo de hidrógeno,

(2) un grupo hidroxilo o

(3) un grupo alcoxi C_{1-6} ; y

R^2 representa

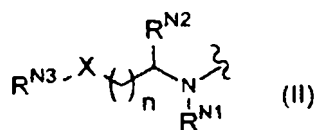
(1) un átomo de hidrógeno,

(2) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,

(3) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,

(4) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,

(5) la fórmula (II):



(en la que,

A)

n representa un número entero de 0 a 4;

X representa

i) $-\text{CHR}^{N4}-$,

ii) $-\text{NR}^{N5}-$ o

iii) $-\text{O}-$;

R^{N1} y R^{N2} son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa

i) un átomo de hidrógeno o

ii) un grupo alquilo C_{1-6} ;

R^{N3} y R^{N4} son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa

i) un átomo de hidrógeno,

ii) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,

iii) un grupo alquilo C_{2-10} insaturado que puede tener un sustituyente,

iv) un grupo alcoxi C_{1-6} que puede tener un sustituyente,

v) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,

ES 2 343 843 T3

- vi) un grupo heteroarilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- vii) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,
- viii) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede tener un sustituyente,
- ix) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede tener un sustituyente,
- x) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- xi) un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- xii) $-NR^{N6}R^{N7}$ (en la que R^{N6} y R^{N7} son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-6}) o
- xiii) R^{N3} y R^{N4} se unen junto con el átomo de carbono al que están unidos para formar un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente (el grupo heterocíclico no aromático puede tener un sustituyente);

R^{N5} representa

- i) un átomo de hidrógeno,
- ii) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- iii) un grupo alquilo C_{2-10} insaturado que puede tener un sustituyente,
- iv) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,
- v) un grupo heteroarilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- vi) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,
- vii) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede tener un sustituyente,
- viii) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede tener un sustituyente,
- ix) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- x) un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente, o
- xi) R^{N3} y R^{N5} se unen conjuntamente con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente (el grupo heterocíclico no aromático puede tener un sustituyente),

B)

X, n, R^{N3} , R^{N4} y R^{N5} representan los grupos definidos anteriormente; y R^{N1} y R^{N2} representan un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros en el que R^{N1} y R^{N2} están unidos juntos para formarlo y que puede tener un sustituyente,

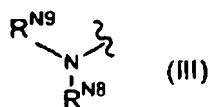
C)

X, n, R^{N2} , R^{N4} y R^{N5} representan los grupos definidos anteriormente, y R^{N1} y R^{N3} representan un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros en el que R^{N1} y R^{N3} están unidos juntos para formarlo y que puede tener un sustituyente, o

D)

X, n, R^{N1} , R^{N4} y R^{N5} representan los grupos definidos anteriormente; y R^{N2} y R^{N3} representan un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros en el que R^{N2} y R^{N3} están unidos juntos para formarlo y que puede tener un sustituyente), o

(6) la fórmula (III):



(en la que, R^{N8} y R^{N9} son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa

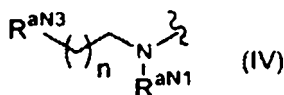
- i) un átomo de hidrógeno,
- ii) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- iii) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,
- iv) un grupo heteroarilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente
- v) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente, o
- vi) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente)).

2. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 1, en el que R^2 es

- 1) un átomo de hidrógeno;
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 3) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente o
- 4) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente.

3. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 1, en el que R^2 se representa por la siguiente fórmula (IV):

Fórmula (IV)



(en la que n representa un número entero de 0 a 4;

R^{aN1} representa

- 1) un átomo de hidrógeno o
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} ; y

R^{aN3} representa

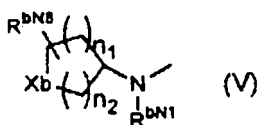
- 1) un átomo de hidrógeno
- 2) un grupo N-alquilamino C_{1-6} ,
- 3) un grupo N,N-di-alquilamino C_{1-6} ,
- 4) un grupo etilmetilamino,
- 5) un grupo piridilo,

ES 2 343 843 T3

- 6) un grupo pirrolidin-1-ilo,
- 7) un grupo piperidin-1-ilo,
- 8) un grupo morfolin-4-ilo o
- 9) un grupo 4-metilpiperazin-1-ilo).

4. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 1, en el que R^2 se representa por la siguiente fórmula (V):

Fórmula (V)



(en la que n_1 y n_2 son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa un número entero de 0 a 4;

X_b representa

- 1) $-\text{CHR}^{bN4}-$,
- 2) $-\text{NR}^{bN5}-$ o
- 3) $-\text{O}-$;

R^{bN1} representa

- 1) un átomo de hidrógeno o
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} ;

R^{bN8} representa

- 1) un átomo de hidrógeno,
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} ,
- 3) un grupo arilo C_{6-14} o
- 4) un grupo aralquilo C_{7-10} ;

R^{bN4} representa

- 1) un átomo de hidrógeno,
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 3) un grupo alquilo C_{2-10} insaturado que puede tener un sustituyente,
- 4) un grupo alcoxi C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 5) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,
- 6) un grupo heteroarilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- 7) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,
- 8) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede tener un sustituyente,
- 9) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede tener un sustituyente,
- 10) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,

ES 2 343 843 T3

11) $\text{NR}^{\text{bN6}}\text{R}^{\text{bN7}}$ (en la que R^{bN6} y R^{bN7} son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-6}) o

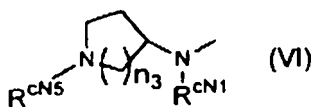
12) un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente; y

R^{bN5} es

- 1) un átomo de hidrógeno,
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 3) un grupo alquilo C_{2-10} insaturado que puede tener un sustituyente,
- 4) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,
- 5) un grupo heteroarilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente
- 6) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,
- 7) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede tener un sustituyente,
- 8) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede tener un sustituyente,
- 9) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente o
- 10) un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente).

5. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 1, en el que R^2 se representa por la siguiente fórmula (VI):

Fórmula (VI)



(en la que n_3 representa el número entero 1 ó 2;

R^{cN1} representa

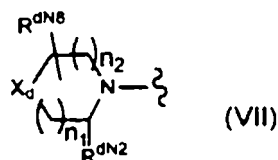
- 1) un átomo de hidrógeno o
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} ; y

R^{cN5} representa

- 1) un átomo de hidrógeno o
- 2) un grupo alquilo C_{1-6}).

6. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 1, en el que R^2 se representa por la siguiente fórmula (VII):

Fórmula (VII)



ES 2 343 843 T3

(en la que n_1 y n_2 son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa un número entero de 0 a 4;

X_d representa

- 1) $-\text{CHR}^{\text{dN4}}-$,
- 2) $-\text{NR}^{\text{dN5}}-$ o
- 3) $-\text{O}-$; y

R^{dN2} representa

- 1) un átomo de hidrógeno o
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} ;

R^{aN8} representa

- 1) un átomo de hidrógeno,
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} ,
- 3) un grupo arilo C_{6-14} o
- 4) un grupo aralquilo C_{7-10} ;

R^{dN4} representa

- 1) un átomo de hidrógeno,
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 3) un grupo alquilo C_{2-10} insaturado que puede tener un sustituyente,
- 4) un grupo alcoxi C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 5) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,
- 6) un grupo heteroarilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- 7) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,
- 8) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede tener un sustituyente,
- 9) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede tener un sustituyente,
- 10) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- 11) $-\text{NR}^{\text{dN6}}\text{R}^{\text{dN7}}$ (en el que R^{dN6} y R^{dN7} son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-6}) o
- 12) un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente; y

R^{dN5} representa

- 1) un átomo de hidrógeno,
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 3) un grupo alquilo C_{2-10} insaturado que puede tener un sustituyente,
- 4) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,
- 5) un grupo heteroarilo de anillo de 5 a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- 6) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,
- 7) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede tener un sustituyente,

ES 2 343 843 T3

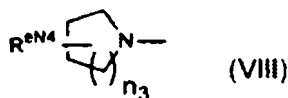
8) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede tener un sustituyente,

9) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente o

10) un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente).

7. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 1, en el que R^2 se representa por la siguiente fórmula (VIII):

Fórmula (VIII)



(en la que n_3 representa un número entero de 1 a 3; y

R^{eN4} representa

1) un grupo amino,

2) un grupo N-alquilamino C_{1-6} ,

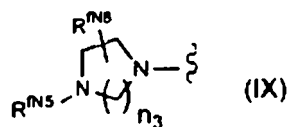
3) un grupo pirrolidin-1-ilo,

4) un grupo piperidin-1-ilo o

5) un grupo morfolin-4-ilo).

8. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 1, en el que R^2 se representa por la siguiente fórmula (IX):

Fórmula (IX)



(en la que n_3 representa un número entero de 1 a 3;

R^{fN8} representa

1) un átomo de hidrógeno,

2) un grupo alquilo C_{1-6} ,

3) un grupo arilo C_{6-14} o

4) un grupo aralquilo C_{7-10} ; y

R^{fN5} es

1) un átomo de hidrógeno,

2) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,

3) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede tener un sustituyente,

4) un grupo heterocíclico no aromático de 3 miembros a 8 miembros que puede tener un sustituyente,

5) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,

ES 2 343 843 T3

6) un grupo heteroarilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,

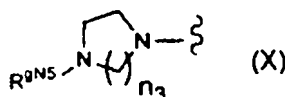
7) un grupo aralkilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,

8) un grupo heteroaralkilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente o

9) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede tener un sustituyente).

9. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 1, en el que R^2 se representa por la siguiente fórmula (X):

Fórmula (X)



(en la que n_3 representa un número entero de 1 a 3; y

R^{NS} representa

1) un átomo de hidrógeno

2) un grupo alquilo C_{1-6} que puede estar sustituido,

3) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede estar sustituido,

4) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede estar sustituido,

5) un grupo aralkilo C_{7-10} que puede estar sustituido,

6) un grupo piridilo que puede estar sustituido o

7) un grupo tetrahidropiranilo que puede estar sustituido).

10. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 1, en el que el compuesto representado por la fórmula (I) es un compuesto cualquiera seleccionado entre el grupo constituido por los siguientes compuestos:

1) (8E,12E,14E)-7-acetoxi-3,6,21-trihidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosan-8,12,14-trien-11-olida,

2) (8E,12E,14E)-7-((4-cicloheptilpiperazin-1-il)-carbonil)oxi-3,6,16,21-tetrahidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosan-8,12,14-trien-11-olida,

3) (8E,12E,14E)-3,6,16,21-tetrahidroxi-7-((4-isopropilpiperazin-1-il)carbonil)oxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosan-8,12,14-trien-11-olida y

4) (8E,12E,14E)-3,6,16,21-tetrahidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-7-((4-metilpiperazin-1-il)carbonil)oxi-18,19-epoxitricosan-8,12,14-trien-11-olida.

11. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 1, que comprende ensayar una expresión reducida de pRB, una expresión de p16 o una expresión aumentada de ciclina E midiendo los niveles de sus ARNm codificantes respectivos.

12. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 11, en el que el procedimiento para medir el nivel del ARNm es un procedimiento de RT-PCR cuantitativo.

13. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 11, en el que el procedimiento para medir el nivel del ARNm es un procedimiento de punta de ADN.

14. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 1, que comprende ensayar una expresión reducida de pRB, una expresión de p16 o una expresión aumentada de ciclina E midiendo los niveles de sus proteínas respectivas.

15. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 14, en el que el procedimiento para medir los niveles de sus proteínas respectivas es un procedimiento de transferencia de western.

5 16. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 14, en el que el procedimiento para medir los niveles de sus proteínas respectivas es un procedimiento de inmunohistotinción.

17. El procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 14, en el que el procedimiento para medir los niveles de sus proteínas respectivas es un procedimiento ELISA.

10 18. Un kit para su uso en el procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 12, que comprende un cebador que contiene al menos 15 secuencias de bases consecutivas de los genes de pBR, p16 o ciclina E.

15 19. Un kit para su uso en el procedimiento de ensayo de acuerdo con el apartado 15, 16 ó 17, que comprende un anticuerpo contra pRB, p16 o la ciclina E.

20 Una célula cancerosa puede examinarse para aclarar sus características con respecto al bajo nivel de expresión de pRB, la expresión positiva de p16 o el alto nivel de expresión de la ciclina E, lo cual permite la predicción de la sensibilidad de la célula cancerosa al presente compuesto, permitiendo la administración selectiva del presente compuesto sólo a los pacientes con cáncer que es de esperar que se beneficien de la actividad antitumoral del presente compuesto. Se esperan un mayor efecto terapéutico y menos efectos adversos innecesarios.

Mejores modos para realizar la invención

25 En la presente descripción, la pRB es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 110 kDa que se codifica por una secuencia de bases descrita en el Genbank con el N° de Acceso NM000321. El gen RB que codifica pRB se aisló como un gen supresor de tumores que muta en el retinoblastoma (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 9059-9063, 1987) y después su mutación se ha confirmado en diversas células malignas.

30 La p16 es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 16 kDa que se codifica por una secuencia de bases descrita en el Genbank con el N° de Acceso HM000077. La p16 se une a CDK4 y CDK6 y reprime la fosforilación por CDK4/6 de pRB, ayudando de esta manera a que pRB conserve la actividad (Science 264: 436-440, 1994).

35 La ciclina E es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 52 kDa que se codifica por una secuencia de bases descrita en el Genbank con el N° de Acceso M74093, y su nivel de expresión aumenta temporalmente en la transición G1/S del ciclo celular para jugar un papel principal para la progresión del ciclo celular. Sin embargo, se ha notificado que el cáncer aumenta su nivel absoluto y altera el patrón de su aumento temporal de la expresión (Int. J Cancer 104: 369-75, 2003).

40 Además, se ha notificado una correlación inversa entre p16 y pBR en el nivel de expresión en muchos tipos de cáncer y, por lo tanto, la expresión positiva de p16 y el bajo nivel de expresión de pRB se consideran atribuidos al mismo acontecimiento (EMBO J. 14: 503-511, 1995).

45 El presente compuesto puede fabricarse por procedimientos descritos en los documentos WO 02/060890, WO 03/099813 y WO 04/011661. Además, en los documentos WO 02/060890, WO 03/099813 y WO 04/011661 se describe que el presente compuesto tiene actividad anticancerosa.

50 La presente invención es un procedimiento de ensayo para predecir la sensibilidad de una célula cancerosa al presente compuesto, que comprende examinar las características de la célula cancerosa con respecto al bajo nivel de expresión de pRB, la expresión positiva de p16 o un alto nivel de expresión de la ciclina E. La célula cancerosa puede ser una célula extraída como una muestra del tejido canceroso o una célula cultivada *in vitro*, y preferentemente es una célula recogida de un tejido canceroso por biopsia, y más preferentemente el tejido canceroso es un tejido canceroso recogido por biopsia para el diagnóstico de un cáncer.

55 Un paciente con cáncer, cuyas células cancerosas recogidas se han considerado altamente sensibles al presente compuesto por el procedimiento de la presente invención, puede seleccionarse para administrar el presente compuesto esperando que el paciente se beneficie por la actividad anticancerosa del presente compuesto. Por consiguiente, se esperan mejores efectos terapéuticos y menos efectos adversos innecesarios.

60 En la presente invención, el procedimiento para examinar las características de la célula cancerosa con respecto al bajo nivel de expresión de pBR, la expresión positiva de p16 o un alto nivel de expresión de ciclina E puede ser un procedimiento para medir el nivel de ARNm transcrito o un procedimiento para medir el nivel de proteínas traducidas. El procedimiento para medir el nivel de ARNm incluye un procedimiento de RT-PCR y un procedimiento de punta de ADN, y el procedimiento para medir el nivel de proteína incluye un procedimiento de transferencia de western, un procedimiento de inmunohistotinción, y un procedimiento ELISA. Puede usarse cualquier procedimiento para medir un nivel de expresión y la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Además, la presente invención incluye una realización en la que la mutación de la proteína (Reports concerning mutation of pRB: Proc Natl Acad Sci USA 87: 6922-6, 1990; Proc Natl Acad Sci USA 87:6-10, 1990) que es sustancialmente igual a la reducción de la expresión se detecta como el ADN/ARNm mutado analizando las secuencias de bases o la movilidad electroforética del ADN/ARNm (Oncogene 8: 1913-9, 1993), o una realización en la que la proteína mutada se detecta por un anticuerpo o movilidad electroforética que pueden identificar la mutación.

En lo sucesivo, se describirá con detalle el procedimiento para medir el nivel de expresión de pRB, p16 y ciclina E a partir de tejidos tumorales muestreados, y el nivel de expresión también puede medirse a partir de las células cultivadas por el mismo procedimiento, y por lo tanto la presente invención no está limitada a estos procedimientos.

1. Procedimiento de RT-PCR

Se prepara un ARNm a partir de un tejido tumoral muestreado por un procedimiento rutinario (Experimental Medicine, número extra, "PCR and its application" 8: 1063-1071, 1990). El nivel de expresión de pRB/p16/ciclina E puede medirse usando un ARNm preparado como molde por RT-PCR. En la RT-PCR, la reacción de transcripción inversa y la posterior PCR (RT-PCR) pueden realizarse usando un Core Kit de RT-PCR a tiempo real (Takara Code PR032A) o similar.

Para medir el nivel de expresión por cuantificación del ARNm, es preferible la RT-PCR cuantitativa. Aunque ha habido informes de diversos procedimientos de RT-PCR cuantitativa (Genome Res. 6: 986-994, 1996), es deseable la RT-PCR competitiva, en la que la RT-PCR se realiza en coexistencia con una cantidad conocida de ARN molde competitivo que se amplifica preferentemente por el mismo cebador, y se determinan las cantidades de los dos productos amplificados para comparar.

Se prepara un cebador para detectar un ARNm que codifica pRB/p16/ciclina E (denominado ARNm diana) basándose en la información de secuencia descrita en el Número de Acceso del Genbank mencionado anteriormente. Y se prepara un ARN molde competitivo que tiene la secuencia complementaria al cebador pero tiene un peso molecular diferente o un sitio de escisión por enzimas de restricción diferente de los del ARNm diana para la determinación. El cebador se dirige a un sitio en el que con frecuencia se produce la mutación (el sitio en pRB se indicó en Proc Natl Acad Sci USA 87: 6922-6, 1990; Proc Natl Acad Sci USA 87: 6-10, 1990), con lo que sólo puede determinarse la proteína mutada o sólo la proteína normal.

La RT-PCR se realiza añadiendo la cantidad conocida diluida de ARN molde competitivo a la muestra de ARNm preparada a partir del tejido tumoral y añadiendo el cebador a la misma. Basándose en los pesos moleculares de los productos amplificados o un producto digerido por enzimas de restricción del mismo, se determina si procede del ARNm diana o el ARN molde competitivo, y se calcula un valor cuantitativo del ARNm diana mediante una relación de los productos amplificados y la cantidad del ARN molde competitivo añadido. El nivel de ARNm puede medirse como un valor relativo en comparación con un ARNm de actina o ARNr 18S o similar que se expresan universalmente. Se mide el nivel de ARNm de pRB/p16/ciclina E en células cancerosas muy sensibles y poco sensibles para decidir un valor límite, y después se compara con el valor límite para juzgar el nivel de expresión.

Además, la aparición de bandas electroforéticas con diferente movilidad de la de la célula convencional o la detección de proteínas mutadas es decisiva en el bajo nivel de expresión.

La célula cancerosa, que tiene características de bajo nivel de expresión de pRB, expresión positiva de p16 o alto nivel de expresión de ciclina E, preferentemente en el caso de un bajo nivel de expresión de pRB y alto nivel de expresión de ciclina E, o expresión positiva de p16 y alto nivel de expresión de ciclina E, se considera altamente sensible al presente compuesto.

2. Procedimiento de punta de ADN

Se extrae un ARNm a partir de un tejido tumoral muestreado por un procedimiento rutinario (Experimental Medicine, número extra, "PCR and its application" 8: 1063-1071, 1990), se marca con fluorescencia por reacción de transcripción inversa y el ADNc marcado sintetizado se hibrida en una micromatriz (IntelliGene Human Cancer CHIP Ver. 4.0, X102, TAKARA BIO INC.) en la que se aplica de forma puntual el oligonucleótido de un gen asociado con cáncer (Nature genetics supplement 21; 10-14; 1999).

La muestra de tejido tumoral y la muestra de tejido normal se marcan con diferentes colorantes fluorescentes tales como Cy3 (rojo) y Cy5 (verde) para juzgar en qué muestra aumentan los genes. El software de análisis informático hace posible la presentación de imágenes. Por ejemplo, muestra una imagen roja cuando el gen hibridado con el ADNc marcado se amplifica más cuando procede de la muestra de tejido tumoral que cuando procede de la muestra de células normales, una imagen amarilla cuando la amplificación es igual y una imagen verde cuando se amplifica menos. La intensidad de estas señales se digitaliza por el software de análisis informático, con lo que se calculan los datos de la relación de expresión genética entre ellos (Cy3 = tejido canceroso/Cy5 = tejido normal), y si la relación de expresión es 2 o más o 1/2 o menos, preferentemente 3 o más o 1/3 o menos, una diferencia en la expresión se considera significativa.

Cuando la pRB es verde, el p16 es amarillo o rojo, o la ciclina E es roja, la célula cancerosa se considera muy sensible al presente compuesto. Preferentemente, cuando la pRB es verde y la ciclina E es roja, o la p16 es amarilla o roja y la ciclina E es roja, se considera que la célula cancerosa es muy sensible al presente compuesto.

3. Procedimiento de Transferencia de Western

El anticuerpo anti-pRB/anticuerpo anti-p16/anticuerpo anti-ciclina E usado en el siguiente procedimiento de transferencia de western, procedimiento de inmunohistotinción y procedimiento ELISA pueden ser anticuerpos disponibles en el mercado. Por ejemplo, para el anticuerpo anti-pRB, el anticuerpo de Rb puede obtenerse en Cell Signaling Technology, Inc. (Nº de Catálogo 9302), para el anticuerpo anti-p16, p16 (C-20) puede obtenerse en Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Nº de Catálogo sc-468), y para el anticuerpo anti-ciclina E, puede obtenerse anti-ciclina E humana purificado en Pharmingen/BD Company (Nº de Catálogo 554182).

Además, los anticuerpos pueden prepararse por inmunización con un antígeno preparado basándose en la información descrita en el Número de Acceso del Genbank mencionado anteriormente. El antígeno puede obtenerse preparando un vector de expresión de pRB/p16/ciclina E basándose en la información de secuencia descrita en el Número de Acceso del Genbank mencionado anteriormente y purificando la proteína pRB/p16/ciclina E a partir de la célula de expresión en la que se introduce el vector. Estas proteínas preferentemente se expresan como proteínas de fusión para facilitar la purificación. Y como el otro procedimiento, el antígeno puede prepararse sintetizando un péptido basándose en la información de secuencia descrita en el Número de Acceso del Genbank mencionado anteriormente y combinándolo con una proteína de soporte. El anticuerpo puede purificarse a partir de un suero que se obtiene a partir de un animal inmunizado con el antígeno, o un cultivo de un hibridoma que se prepara a partir de la célula productora de anticuerpos obtenida.

Además, para detectar la mutación de pRB/p16/ciclina E, sobre todo de pRB, se expresa una proteína mutada con la mutación descrita en Proc Natl Acad Sci USA 87: 6922-6, 1990; Proc Natl Acad Sci USA 87: 6-10, 1990, o se sintetiza un péptido con sitios de mutación y se inmuniza a un animal con la proteína/péptido, obteniéndose de esta manera un anticuerpo que responde específicamente a la proteína mutada. Por el contrario, también puede prepararse un anticuerpo que responde a proteínas normales pero no a proteínas mutadas, por inmunización con la proteína normal. El procedimiento para preparar el anticuerpo se describe en Methods in Enzymology 182, p663-679.

Se prepara una muestra para SDS-PAGE que incluye pRB/p16/ciclina E a partir del tejido tumoral muestreado. Específicamente, el tejido tumoral se homogeneiza usando una solución de preparación de células (que preferentemente contiene cada inhibidor de proteasa y un 10% de glicerol), se mezcla con una cantidad igual de tampón de muestra para SDS-PAGE y se trata térmicamente a 97°C durante cinco minutos, obteniéndose de esta manera la muestra para SDS-PAGE, por ejemplo. El procedimiento de transferencia de western puede realizarse de acuerdo con el procedimiento descrito en Methods in Enzymology 182, p679, 688, sin embargo, puede realizarse concretamente como se indica a continuación, por ejemplo.

Se separa una cierta cantidad de cada muestra por SDS-PAGE, se transfiere a una membrana Hybond ECL, se hace reaccionar con el anticuerpo anti-pRB/p16/ciclina E y se hace reaccionar con el segundo anticuerpo marcado con enzima, para detectar la pRB/ciclina E/p16 transferida a la membrana Hybond ECL por actividad enzimática. Como controles preferibles, se aplica al mismo tiempo la célula patrón que muestra la expresión de pRB/p16/ciclina E, más preferentemente la célula MDA-MB435 que muestra expresión de todas ellas, y la comparación con la expresión en la célula MDA-MB435 determina la expresividad.

Además, la aparición de bandas con diferente movilidad electroforética de la de la célula patrón o la detección de proteínas mutadas es decisiva en el bajo nivel de expresión.

La célula cancerosa, que tiene características de bajo nivel de expresión de pRB, expresión positiva de p16 o alto nivel de expresión de ciclina E, preferentemente en el caso de bajo nivel de expresión de pRB y alto nivel de expresión de ciclina E, o expresión positiva de p16 y alto nivel de expresión de ciclina E, se considera muy sensible al presente compuesto.

4. Procedimiento de Inmunohistotinción

El procedimiento de inmunohistotinción puede realizarse de acuerdo con un procedimiento descrito en Experimental Medicine, volumen separado (Immunostaining in post-genome era, *in situ* hybridization, 1997) y puede realizarse concretamente como se indica a continuación, por ejemplo.

El tejido tumoral muestreado se infiltra con un agente de inclusión para obtener un bloque, que después se corta en piezas de 2-8 µm de espesor y se aplica en un portaobjetos para preparar una muestra de tejido. El anticuerpo anti-pRB, el anticuerpo anti-p16 o el anticuerpo anti-ciclina E se hace reaccionar con la muestra de tejido y después se tiñe por interacción avidina-biotina en una técnica inmunoenzimática (J. Histochem. Cytochem. 27; 1131-1139, 1979). El bajo nivel de expresión de pRB, la expresión positiva de p16 y el alto nivel de expresión de ciclina E se juzgan comparando la intensidad de tinción de pRB/p16/ciclina E entre el tejido del tumor y el tejido normal en la muestra de tejido teñida. La detección de proteínas mutadas es decisiva en la expresión de bajo nivel.

La célula cancerosa, que tiene características de bajo nivel de expresión de pRB, expresión positiva de p16 o alto nivel de expresión de ciclina E, preferentemente en el caso de bajo nivel de expresión de pRB y alto nivel de expresión de ciclina E, o expresión positiva de p16 y alto nivel de expresión de ciclina E, se considera muy sensible al presente compuesto.

5. Procedimiento ELISA

El procedimiento ELISA puede realizarse de acuerdo con un procedimiento descrito en Antibodies A Laboratory Manual (Ed Harlow *et al*, Cold Spring Harbor Laboratory), y puede realizarse concretamente como se indica a continuación, por ejemplo.

Se prepara una fracción que incluye pRB/p16/ciclina E a partir del tejido tumoral muestreado. En concreto, el tejido tumoral se homogeneiza con una solución de preparación de células (que preferentemente contiene cada inhibidor de proteasa y un 10% de glicerol), a la que se añade un 1% de NP-40 para obtener una fracción soluble y un residuo. La fracción soluble se usa directamente para el procedimiento ELISA, o el residuo se somete a extracción usando NaCl 0,5 M y se usa para el procedimiento ELISA después de que la concentración de NaCl se haya reducido a 0,1-0,15 M.

La fracción soluble y la fracción extraída con NaCl se aplican a una placa de 96 pocillos recubierta con el anticuerpo anti-pRB, el anticuerpo anti-p16 o el anticuerpo anti-ciclina E para reaccionar con el anticuerpo. La pRB, p16 o ciclina E que se une al anticuerpo aplicado como un recubrimiento se intercala con un anticuerpo marcado con enzima para cada proteína, y la pRB, p16 o ciclina E expresada en el tejido tumoral se determina midiendo la actividad de la enzima de unión.

Se miden las cantidades de la pRB/p16/ciclina E en células cancerosas muy sensibles y poco sensibles para decidir un valor límite, y la comparación con el nivel límite determina la expresividad.

La célula cancerosa, que tiene características de bajo nivel de expresión de pRB, expresión positiva de p16 o alto nivel de expresión de ciclina E, preferentemente en el caso de bajo nivel de expresión de pRB y alto nivel de expresión de ciclina E, o expresión positiva de p16 y alto nivel de expresión de ciclina E, se considera muy sensible al presente compuesto.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un resultado de análisis de los niveles de expresión de pRB/ciclina E/p16/ciclina D1 en cada línea de células cancerosas humanas, por transferencia de western.

La Fig. 2 es un resultado de análisis de los niveles de expresión de pRB/p16/ciclina E en las cepas de SY-1, H-526 y H-460 por inmunohistotinción.

La Fig. 3 es un resultado de análisis de los niveles de expresión de p16/ciclina E en una muestra clínica de cáncer endometrial por inmunohistotinción.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra correlaciones entre el nivel de ARNm de p16 y el % de T/C, y entre el nivel de ARNm de p16 y el nivel de expresión de la proteína p16.

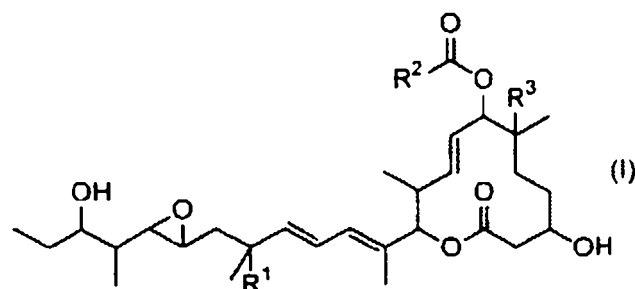
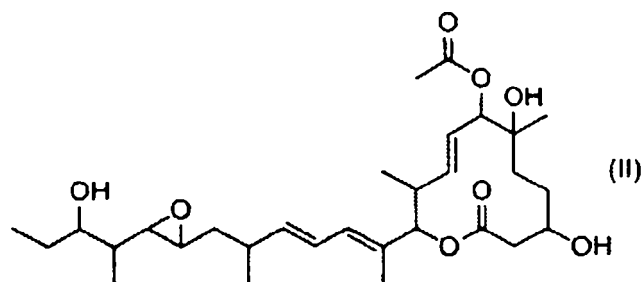
Ejemplos

En lo sucesivo se describirán ejemplos para demostrar la utilidad de la presente invención, pero son ejemplares y la invención no se limita a los siguientes ejemplos concretos en ningún caso.

Ejemplo 1

Análisis de expresión de moléculas relacionadas con el ciclo celular en 25 líneas celulares de cáncer humano incluyendo BSY-1 y WiDr

En 25 líneas de células cancerosas humanas incluyendo BSY-1 que mostraba una alta sensibilidad a (8E,12E,14E)-7-acetoxi-3,6,21-trihidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosano-8,12,14-trien-11-olida (denominada en lo sucesivo compuesto 1) representada por la siguiente fórmula II en el documento WO 02/060890, y WiDr que mostraba sensibilidad a los compuestos que se representan por la fórmula I en el documento WO 03/099813 en la que R1 es un grupo hidroxilo, se analizó la expresión de las moléculas relacionadas con el ciclo celular pRB, p16, ciclina E y ciclina D1 por el procedimiento de transferencia de western.



Las 25 líneas de células cancerosas humanas se implantaron por vía subcutánea en los costados de ratones desnudos, se recogieron los tumores cuando alcanzaron un volumen tumoral de 100 mm³ o mayor y se homogeneizaron con una solución de preparación de células que incluía cada inhibidor de proteasa (Leupeptina, p-APMSF, EDTA, o-NaV04) y un 10% de glicerol, estando ajustada la solución de preparación celular por peso de la muestra tumoral para tener una cantidad constante. Cada solución de preparación celular se mezcla con una cantidad igual de tampón de muestra para SDS-PAGE y se trata con calor a 97°C durante cinco minutos para obtener la muestra para SDS-PAGE. Una cierta cantidad de cada muestra para SDS-PAGE se separa por SDS-PAGE, se transfiere a la membrana Hybond ECL, se hace reaccionar con el anticuerpo anti-pRB/ciclina E/p16/ciclina D1. Después, se hizo reaccionar con el segundo anticuerpo marcado con HRP, y se mezcló con un sustrato de quimioluminiscencia (Super Signal: PIERCE), para detectar una banda de la pRB/ciclina E/p16/ciclina D1 usando Image Master VDS-CL (Amersham Pharmacia).

Como control para la comparación relativa del nivel de expresión de pRB/p16/ciclina E/ciclina D1 en cada línea de células cancerosas, se aplicaron células de MDA-MB435 que mostraban expresión de todas las moléculas a todas las SDS-PAGE y la detección se realizó de la misma manera.

Los resultados se muestran en la Fig. 1. BSY-1, que mostró una alta sensibilidad, tenía características de delección de pRB, expresión de p16 y un alto nivel de expresión de ciclina E, por lo tanto, se estudió si estas características estaban asociadas o no con la sensibilidad al presente compuesto *in vivo*.

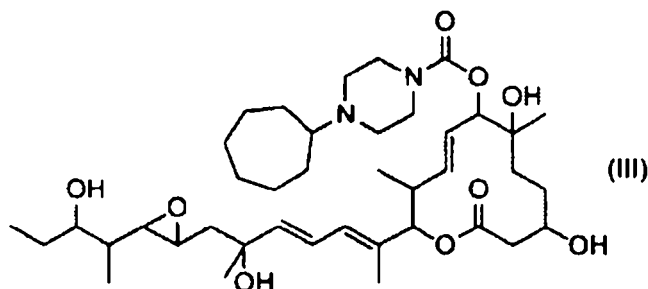
En la Fig. 1, los códigos A-Z, E, A1-E1 y E muestran sus líneas de células cancerosas humanas respectivas como se indica a continuación.

A : BSY-1 (mama)	K : FaDu (cabeza y cuello)	U : DLD-1 (colorrectal)
B : MDA-MB-468 (mama)	L : LC-6-JCK (NSCLC)	V : PC-3 (próstata)
C : HBC-4 (mama)	M : Lu99 (NSCLC)	W : NCI-H510A (SCLC)
D : KPL-4 (mama)	N : NC-H460 (NSCLC)	X : NCI-H522 (SCLC)
E : MDA-MB-435 (mama)	O : NCI-H596 (NSCLC)	Y : WiDr (colorrectal)
F : NCI-H146 (SCLC)	P : Calu-1 (NSCLC)	Z : DU145 (próstata)
G : NCI-H69 (SCLC)	Q : PC14 (NSCLC)	A1: DMS114 (NSCLC)
H : NCI-H526 (SCLC)	R : HT-29 (colorrectal)	B1: Colo320DM (colorrectal)
I : NIH :OVCAR-3 (ovario)	S : SW620 (colorrectal)	C1: COL-3 (colorrectal)
J : SK-OV - 3 (ovario)	T : KM12 (colorrectal)	D1: Lovo (colorrectal)
		E1: MKN45 (estómago)

Ejemplo 2

Correlación entre la expresión de pRB/p16/ciclina E/ciclina D1 y la sensibilidad al presente compuesto

Con respecto a las 25 líneas de células cancerosas humanas que se estudiaron en la expresión de pRB/p16/ciclina E/ciclina D1 en el Ejemplo 1, se evaluó la sensibilidad al representante de los presentes compuestos [(8E,12E,14E)-7-((4-cicloheptilpiperazin-1-il)carbonil)oxi-3,6,16,21-tetrahidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosano-8,12,14-trien-11-olida] (denominada Compuesto 2) representado por la siguiente fórmula (III).



Las 25 células cancerosas humanas que proliferaron en matraces de cultivo o en los tejidos subcutáneos de los ratones desnudos se implantaron por vía subcutánea en los costados de ratones desnudos, y los ratones se clasificaron en un grupo de 5 ratones de control y un grupo de 5 ratones tratados con el compuesto 2, de forma que el volumen medio del tumor de cada grupo fuera uniforme cuando se alcanzó un volumen de tumor de 100 mm³ o mayor. Los ratones del grupo tratado se sometieron a una infusión intravenosa de 10 mg/kg/día durante cinco días, y los ratones del grupo de control no se trataron o se sometieron a infusión con el vehículo. El volumen del tumor se midió desde el día 1, después se midió a lo largo del tiempo los días 5, 8, 12 y 15 y se estimó una relación relativa de volumen del tumor (%T/C).

En la Tabla 1 se muestran correlaciones entre la expresión de pRB/p16/ciclina E/ciclina D1 y la sensibilidad al compuesto 2. El nivel de expresión de pRB/ciclina E/p16/ciclina D1 en la línea de células cancerosas humanas analizada en el Ejemplo 1 se evaluó relativamente, estando la ausencia de expresión representada por “-” y la expresión representada por “+ a +++” de acuerdo con la intensidad, y se mostró conjuntamente con los resultados de la relación de volumen de tumor (%T/C). Además, los niveles de expresión de pRB en la línea de células de cáncer microcítico de pulmón, la línea de cáncer de ovario y la línea celular de cáncer de próstata (Oncogen 9, 3375-3378, 1994; Prostate 21, 145-52, 1992; Exp Cell Res, 233, 233-9, 1997) que según se había notificado expresaban pRB mutada, se describieron con “()”.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Nivel de Expresión de pRB/p16/ciclina E/ciclina D1 y sensibilidad al compuesto 2

	Línea celular	pRB	P16	Ciclina E	Ciclina D1	% T/C
5	BSY-1	-	++	+++	+++	0
10	MDA-MB468	-	+	+++	++	0
	LC-6-JCK	-	++	+++	+	0
	OVCAR3	(+)	++	+++	++	0
15	NCI-H146	(±)	++	+++	±	1
	NCI-H69	(++)	++	(±)	±	1
	NCI-H526	(+)	++	+	±	1
20	PC-3	++	-	++	+++	2
	FaDu	+	-	±	+++	3
	WiDr	+	-	+++	+++	4
25	HBC4	-	-	++	++	5
	Lu99	+++	-	±	±	8
	NCI-H510	(+)	++	+	±	10
30	NCI-H596	-	++	+++	+	18
	KL-4	+	-	+	+++	23
	SK-OV-3	+++	-	++	+++	27
35	DU145	-	-	+++	++	28
	MDA-MB435	+++	+	++	+++	28
	HT-29	+	-	+	±	28
40	SW620	+++	-	+	++	28
	NCI-H460	+++	-	+	±	33
	KM12	++	-	+	++	34
45	NCI-H522	+	-	+++	+++	42
	DLD-1	++	-	+	+++	47
	Calu-1	+	-	++	++	55

50 De las 25 líneas de células cancerosas humanas examinadas, 11 líneas de células cancerosas en las que no pudieron detectarse bandas por transferencia de western (representadas por "-") o no se había informado que tuvieran mutación o delección según la información bibliográfica (representadas con paréntesis), se clasificaron en un grupo de bajo nivel de expresión de pRB incluyendo 7 cepas (64%) que mostraron %T/C ≤ 1%. Por otra parte, 14 cepas de expresión de pRB no incluían las líneas de células cancerosas de %T/C ≤ % (p = 0,0006), lo que demuestra que la sensibilidad al compuesto 2 podía ensayarse por una expresión de bajo nivel de pRB.

55 Además, 7 cepas (70%) de 10 células cancerosas de expresión positiva de p16 mostraron un valor de %T/C ≤ 1%, mientras que 15 cepas de ausencia de expresión de p16 no incluían la línea de células cancerosas de %T/C ≤ 1% (p = 0,0002) y por lo tanto la sensibilidad al compuesto 2 podía ensayarse por expresión positiva de p16, al igual que por un bajo nivel de expresión de pRB.

60 De las 25 líneas de células cancerosas examinadas, 11 cepas se clasificaron en un grupo de bajo nivel de expresión de pRB (las bandas no podían detectarse por transferencia de western, o se había notificado mutación y delección en la información bibliográfica) incluyendo 9 cepas que expresaban p16. Por el contrario, 9 de 10 cepas de expresión de p16 mostraban un bajo nivel de expresión de pRB, y las células cancerosas de expresión positiva de p16 coincidían aproximadamente con las células cancerosas de bajo nivel de expresión de pRB, como se notifica (EMBO J. 14: 503-511, 1995).

En términos del alto nivel de expresión de la ciclina E, 5 (56%) de 9 cepas de alto nivel de expresión (+++) mostraron $\%T/C \leq 1\%$, mientras que 2 (13%) de 16 cepas de las células cancerosas sin alto nivel de expresión mostraron $\%T/C \leq 1\%$, por consiguiente, las células cancerosas de alto nivel de expresión de ciclina E eran muy sensibles ($p = 0,02$).

Los efectos del compuesto 2 sobre 5 cepas que incluían 4 cepas que mostraron la eliminación completa del tumor ($\%T/C = 0\%$) y NCI-H146 que no se eliminaba pero mostraba una reducción consecutiva del tumor durante un largo período, se consideraron curativos, y todas estas cepas mostraron las características de un bajo nivel de expresión de pRB, expresión de p16 y un alto nivel de expresión de ciclina E.

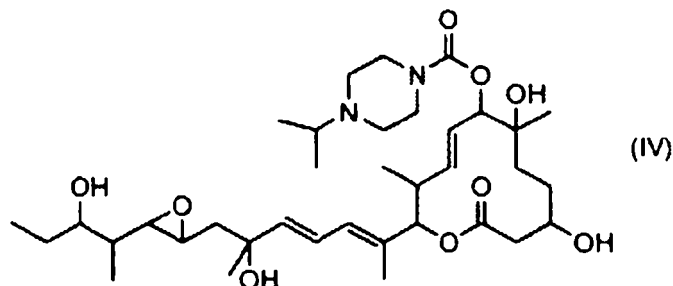
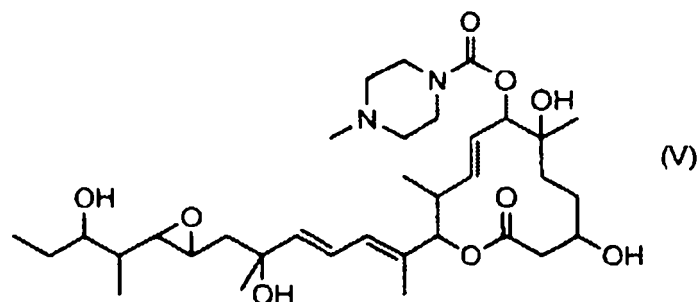
De esta manera, la correlación entre las dos características de un bajo nivel de expresión de pRB y un alto nivel de expresión de ciclina E y los efectos curativos del compuesto 2 indicaron que los efectos curativos aparecían en 5 cepas (71%) de 7 líneas de células cancerosas con las dos características pero no aparecían en las otras 18 líneas de células cancerosas ($p = 0,0001$). Además, en las células cancerosas con dos características de expresión positiva de p16 y alto nivel de expresión de ciclina E, los efectos curativos aparecían en 5 cepas (83%) de 6 líneas de células cancerosas con las dos características, pero no aparecían en las otras 19 líneas de células cancerosas ($p = 0,00002$). El alto nivel de expresión de la ciclina E se convirtió en un indicador más útil al combinarse con los indicadores de bajo nivel de expresión de pRB o expresión positiva de p16.

A partir de estos resultados, la sensibilidad de las líneas de células cancerosas al compuesto 2 resultaron predecibles por examen de las características de bajo nivel de expresión de pRB, expresión de p16 y alto nivel de expresión de ciclina E.

Ejemplo 3

Ensayo de sensibilidad de la línea de células cancerosas a tres compuestos representativos

En relación con el compuesto 1 que mostró una alta actividad antitumoral contra BSY-1 en el documento WO 02/060890, y los compuestos representativos de los presentes compuestos representados por la fórmula 1 que mostraron actividad antitumoral contra WiDr en el documento WO 03/099813, la (8E,12E,14E)-3,6,16,21-tetrahidroxi-7-((4-isopropilpiperazin-1-il)carbonil)oxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosano-8,12,14-trien-11-olida (la siguiente fórmula IV, denominada en lo sucesivo compuesto 3) y la (8E,12E,14E)-3,6,16,21-tetrahidroxi-6,10,12,16, 20-pentametil-7-((4-metilpiperazin-1-il)-carbonil)oxi-18,19-epoxitricosano-8,12,14-trien-11-olida (la siguiente fórmula V, denominada en lo sucesivo compuesto 4), se evaluó la correlación entre las características de bajo nivel de expresión de pRB, expresión de p16 y alto nivel de expresión de ciclina E y la sensibilidad en la línea de células cancerosas humanas.



Las células cancerosas que habían proliferado en matraces de cultivo o en tejidos subcutáneos de los ratones desnudos se implantaron por vía subcutánea en los costados de ratones desnudos, y los ratones se clasificaron en un grupo de 5 ratones de control y un grupo de 5 ratones tratados con los compuestos, de forma que el volumen medio del tumor de cada grupo fuera uniforme cuando se alcanzó un volumen de tumor de 100 mm³ o mayor. Los ratones del grupo tratado se sometieron a una infusión intravenosa de 10 mg/kg/día durante cinco días, y los ratones del grupo de control no se trataron o se sometieron a infusión con el vehículo. El volumen del tumor se midió desde el día 1, y después se midió a lo largo del tiempo los días 5, 8, 12 y 15 y se estimó una relación relativa de volumen del tumor. Sin embargo, el experimento se interrumpió básicamente el día 15 en la evaluación del compuesto 1. En la Tabla 2 se muestra el %T/C de los compuestos 1, 2, 4 y el compuesto 2 del ejemplo 2 con cada célula cancerosa.

Como se muestra en la Tabla 2, aunque el compuesto 1 mostró un valor de %T/C algo elevado, todos los compuestos ensayados mostraron actividades antitumorales, indicando que la sensibilidad de cada línea de célula cancerosa humana a estos compuestos indicaba la misma tendencia. Cuando se estimó la correlación entre el %T/C de los compuestos 1, 3 y 4 y el del compuesto 2, se obtuvieron proporciones tan elevadas como de 0,724, 0,948 y 0,923. Esto sugirió que cada línea de célula cancerosa tenía una sensibilidad común entre compuestos representados por la fórmula I.

TABLA 2

Correlación entre el efecto antitumoral del compuesto y los de los compuestos 1, 3 y 4

Línea celular	Relación de volumen tumoral (%T/C)			
	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4
BSY-1	0	0	2	N.D.
LC-6-JCK	0	N.D.	0	N.D.
OVCAR3	0	23	N.D.	N.D.
PC-3	2	20	4	3
FaDu	3	33	1	5
WiDr	4	29	4	7
NCI-H596	18	76	N.D.	N.D.
DU145	28	26	34	26
MDA-MB435	28	50	N.D.	N.D.
HT-29	28	58	26	46
SW620	28	N.D.	19	N.D.
NCI-H460	33	53	N.D.	N.D.
NCI-H522	42	64	N.D.	N.D.
DLD-1	47	59	N.D.	N.D.

Ejemplo 4

Análisis de expresión de pRB/p16/ciclina E en BSY-1, H-526, H-460 por inmunohistotinción

Se analizó la expresión de las moléculas relacionadas con el ciclo celular pRB/p16/ciclina E por el procedimiento de inmunohistotinción en BSY-1 que mostraba alta sensibilidad hasta la remisión, H526 que mostraba presenta una alta sensibilidad sin remisión y H460 que mostraba una baja sensibilidad al compuesto 2.

Las 3 líneas de células cancerosas humanas mencionadas anteriormente se implantaron por vía subcutánea en los costados de ratones desnudos, los tumores se recogieron cuando alcanzaron un volumen tumoral de 100 mm³ o mayor y se fijaron con formalina al 10% neutralizada durante un día para preparar un bloque incluido en parafina. El bloque de parafina se cortó en piezas de 4 µm de espesor y se aplicó en un portaobjetos para preparar una muestra para inmunohistotinción. La muestra para inmunohistotinción se desparafinó y se calentó en un incubador para activar la antigenicidad, se bloqueó una peroxidasa endógena y después se hizo reaccionar con un primer anticuerpo contra pRB/p16/ciclina E a temperatura ambiente durante una hora. La muestra se hizo reaccionar con un segundo anticuerpo anti-ratón o anti-conejo marcado con preoxida y se observó al microscopio por visualización de la actividad de la peroxidasa usando DAB como sustrato colorimétrico.

Los resultados se muestran en la Fig. 2. En la inmunohistotinción se obtuvo claramente el mismo resultado que en el procedimiento de transferencia de western. El resultado indicó que la expresión de las moléculas relacionadas con el ciclo celular, pRB/p16/ciclina E podía analizarse incluso usando la muestra de un bloque incluido en parafina usada comúnmente en la práctica clínica.

Ejemplo 5

Análisis de expresión de pRB/p16/ciclina E en muestras clínicas por inmunohistotinción

Se analizó la expresión de moléculas relacionadas con el ciclo celular p16/ciclina E mediante el procedimiento de inmunohistotinción usando muestras clínicas incluidas en parafina (12 tejidos normales y 12 tejidos con cáncer) adquiridas en SuperBioChips Laboratories Inc.

Las muestras clínicas incluidas en parafina se sometieron a inmunohistotinción usando los anticuerpos contra p16/ciclina E de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, en una parte de los tejidos cancerosos, se observó una sobreexpresión de p16 (3 de 12 casos) y la ciclina E (1 de 12 casos), aunque no se observó en los tejidos normales. En la Fig. 3, se mostró el resultado de tinción en cáncer endometrial, sobreexpresándose tanto p16 como ciclina E. El resultado indicó que los tejidos cancerosos en los que se sobreexpresaban las moléculas relacionadas con el ciclo celular p16/ciclina E podían seleccionarse incluso usando la muestra de un bloque de parafina usada en la práctica clínica.

Ejemplo 6

Inmunohistotinción para la expresión de p16/ciclina E en las muestras clínicas (2)

Además del Ejemplo 5, en muchos otros cánceres (10 muestras de cada cáncer; cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer endometrial, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de laringe, carcinoma cervical, linfoma maligno y melanoma maligno; total de 180 muestras), se analizó la expresión de las moléculas relacionadas con el ciclo celular p16/ciclina E por el procedimiento de inmunohistotinción usando muestras de tumores clínicos incluidos en parafina adquiridas en SuperBioChips Laboratories Inc., de la misma manera que en los Ejemplos 4 y 5.

Las muestras clínicas incluidas en parafina se sometieron a inmunohistotinción usando los anticuerpos contra p16/ciclina E de la misma manera que los Ejemplos 4 y 5, y se encontró “la sobreexpresión de p16 y ciclina E” característica en los 10 casos de carcinoma cervical, 4 de 10 casos de cáncer de ovario y 3 de 10 casos de cáncer de mama, como se muestra en la Tabla 2, lo que indica que los tejidos cancerosos de “sobreexpresión de p16 y ciclina E” podían seleccionarse usando la muestra de bloque incluido en parafina de la práctica clínica y que ciertos tejidos cancerosos podían tener frecuentemente la característica de “sobreexpresión de p16 y ciclina E”.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 3

Frecuencia de aparición de “sobreexpresión de p16 y ciclina E” en cada muestra de tumor

	Cánceres	Frecuencia de la sobreexpresión	Cánceres	Frecuencia de la sobreexpresión
5				
10	Cáncer gástrico	1/10	Cáncer de ovario	4/10
	Cáncer de esófago	1/10	Cáncer pancreático	1/10
	Cáncer de pulmón	0/10	Cáncer de próstata	0/8*
15	Cáncer de colon	1/10	Cáncer endometrial	1/10
	Cáncer de tiroides	0/10	Cáncer de la vesícula biliar	1/10
20	Cáncer renal	0/9*	Cáncer laríngeo	1/10
	Cáncer de mama	3/10	Carcinoma cervical	10/10
	Cáncer hepático	0/10	Linfoma maligno	0/10
25	Cáncer de vejiga	2/9*	Melanoma maligno	2/9*

*: Como se excluyeron las muestras no se podían evaluar (tales como las que no incluían las células cancerosas o las que se habían desprendido del portaobjetos), los casos evaluados fueron menos de 10.

Ejemplo 7

35 *Detección de sobreexpresión de p16 por RT-PCR*

Las 28 líneas de células cancerosas humanas se implantaron por vía subcutánea en los costados de ratones desnudos, los tumores se recogieron cuando alcanzaron un volumen tumoral de 100 mm³ o mayor, y se reunieron 3 tumores de cada cáncer. Los tumores se congelaron con nitrógeno líquido y los ARN totales se extrajeron usando TRIzol (SIG-
40 MA) y se purificaron con el Kit RNeasy mini (OIA GEN). Después, se sintetizó ADNc con reactivos de transcripción inversa Taqman® (ABI), y el nivel de ARNm de p16 en cada tumor se midió por sistemas de detección de secuencia (7900HT, ABI) usando ensayos de expresión de genes Taqman® (ABI) de p16 como sonda y reactivos de RT-PCR Taqman® Gold como reactivo de reacción. El valor obtenido se corrigió por el valor de ARNr 18S para estimar los niveles relativos del ARNm de p16.

Los niveles relativos de los ARNm de p16 en las líneas de células cancerosas humanas se recopilaron a partir del nivel de expresión de la proteína p16 determinado por el procedimiento de transferencia de western del Ejemplo 1 y la acción antitumoral %T/C determinada en el Ejemplo 2, y mostrada en la Tabla 3. Además, la Fig. 4 es un gráfico que
50 representa correlaciones entre los niveles de ARNm de p16 y %T/C y entre los niveles de ARNm de p16 y el nivel de expresión de la proteína p16.

Como se muestra en la Tabla 3 y en la Fig. 4, de las 12 cepas de alto nivel de expresión con $\geq 0,3$ del nivel relativo del ARNm de p16, 6 cepas (50%) mostraron %T/C = 1%, mientras que de las 13 cepas de $< 0,3$, sólo una cepa mostró %T/C $\leq 1\%$ (P = 0,02). La medición del nivel de ARNm de p16 demostró que la sensibilidad al compuesto 2 podía
55 ensayarse por exploración en cánceres de la “sobreexpresión de p16”.

Además, la Tabla 3 y la Fig. 4 mostraron una correlación entre el nivel de expresión de la proteína p16, es decir, las 8 cepas que mostraban el nivel de ARNm de p16 y la sobreexpresión de la proteína p16 (++) tenían un valor de $0,5786 \pm 0,3259$ del nivel de ARNm relativo de p16, mientras que, por otra parte, las 2 cepas que mostraban expresión de la proteína p16 (+) tenían un valor de 0,3610, y las 15 cepas que no mostraban expresión de la proteína p16 tenían un valor de $0,2073 \pm 0,2424$. Se considera que los procedimientos de detección del ARNm de p16 como RT-PCR dan los mismos resultados que los obtenidos por el procedimiento de detección de la expresión de la proteína p16.

TABLA 4

Relación entre los niveles de ARNm de p16 y los niveles de expresión de la proteína p16

	Línea celular	Niveles relativos de ARNm de p16	Expresión de proteína p16	%T/C
5				
10	BSY-1	1,2065	++	0
	MDA-MB468	0,1503	+	0
	LC-6-JCK	0,6046	++	0
15	OVCAR3	0,9336	++	0
	NCI-H146	0,4642	++	1
	NCI-H69	0,3556	++	1
20	NCI-H526	0,3372	++	1
	PC-3	0,5174	-	2
	FaDu	0,0060	-	3
25	WiDr	0,2110	-	4
	HBC4	0,0377	-	5
	Lu99	0,0000	-	8
30	NCI-H510	0,4302	++	10
	NCI-H596	0,2971	++	18
	KL-4	0,2822	-	23
35	SK-OV-3	0,0000	-	27
	DU145	0,6043	-	28
40	MDA-MB435	0,5716	+	28
	HT-29	0,2137	-	28
	SW620	0,3177	-	28
45	NCI-H460	0,0001	-	33
	KM12	0,3392	-	34
	NCI-H522	0,0001	-	42
50	DLD-1	0,0000	-	47
	Calu-1	0,1499	-	55

55 Aplicabilidad industrial

Las características de una célula cancerosa con respecto al bajo nivel de expresión de pRB, la expresión positiva de p16 o un alto nivel de expresión de ciclina E pueden examinarse para evaluar la sensibilidad de la célula cancerosa al presente compuesto.

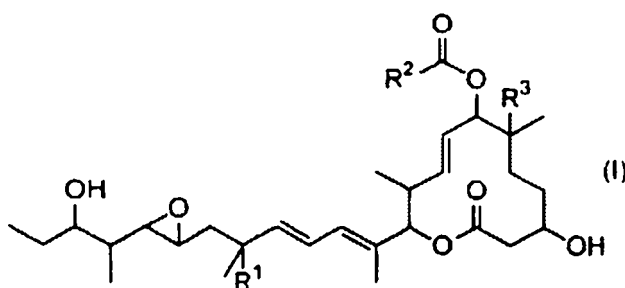
De esta manera, el presente compuesto puede usarse selectivamente en la preparación de un medicamento para el tratamiento selectivo de un cáncer en un paciente con cáncer que es de esperar que se beneficie de la actividad antitumoral del presente compuesto, de forma que pueden esperarse mayores efectos terapéuticos y menos efectos adversos innecesarios.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de ensayo para predecir la sensibilidad de una célula cancerosa a un compuesto representado por la siguiente fórmula I, que comprende usar un índice cualquiera de:

- 1) se reduce la expresión de pRB;
- 2) se expresa p16;
- 3) se potencia la expresión de la ciclina E;
- 4) se reduce la expresión de pRB y se potencia la expresión de la ciclina E; o
- 5) se expresa p16 y se potencia la expresión de la ciclina E:

Fórmula (I)



(en la que, R¹ representa

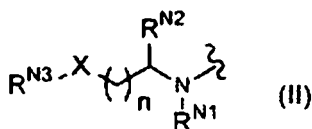
- (1) un átomo de hidrógeno o
- (2) un grupo hidroxilo;

R³ representa

- (1) un átomo de hidrógeno,
- (2) un grupo hidroxilo o
- (3) un grupo alcoxi C₁₋₆; y

R² representa

- (1) un átomo de hidrógeno,
- (2) un grupo alquilo C₁₋₆ que puede tener un sustituyente,
- (3) un grupo aralquilo C₇₋₁₀ que puede tener un sustituyente,
- (4) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- (5) la fórmula (II):



ES 2 343 843 T3

(en la que,

A)

- 5 n representa un número entero de 0 a 4;
- X representa
- 10 i) $-\text{CHR}^{\text{N4}}-$,
- ii) $-\text{NR}^{\text{N5}}-$ o
- iii) $-\text{O}-$;
- 15 R^{N1} y R^{N2} son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa
- i) un átomo de hidrógeno o
- ii) un grupo alquilo C_{1-6} ;
- 20 R^{N3} y R^{N4} son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa
- i) un átomo de hidrógeno,
- 25 ii) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- iii) un grupo alquilo C_{2-10} insaturado que puede tener un sustituyente,
- iv) un grupo alcoxi C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 30 v) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,
- vi) un grupo heteroarilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- 35 vii) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,
- viii) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede tener un sustituyente,
- 40 ix) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede tener un sustituyente,
- x) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- xi) un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- 45 xii) $-\text{NR}^{\text{N6}}\text{R}^{\text{N7}}$ (en la que R^{N6} y R^{N7} son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-6}) o
- 50 xiii) R^{N3} y R^{N4} se unen junto con el átomo de carbono al que están unidos para formar un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente (el grupo heterocíclico no aromático puede tener un sustituyente);
- R^{N5} representa
- 55 i) un átomo de hidrógeno,
- ii) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 60 iii) un grupo alquilo C_{2-10} insaturado que puede tener un sustituyente,
- iv) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,
- v) un grupo heteroarilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- 65 vi) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,
- vii) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede tener un sustituyente,

ES 2 343 843 T3

- viii) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede tener un sustituyente,
- ix) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- x) un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente, o
- xi) R^{N3} y R^{N5} se unen conjuntamente con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente (el grupo heterocíclico no aromático puede tener un sustituyente),

B)

X , n , R^{N3} , R^{N4} y R^{N5} representan los grupos definidos anteriormente; y R^{N1} y R^{N2} representan un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros en el que R^{N1} y R^{N2} están unidos juntos para formarlo y que puede tener un sustituyente,

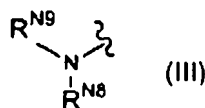
C)

X , n , R^{N2} , R^{N4} y R^{N5} representan los grupos definidos anteriormente, y R^{N1} y R^{N3} representan un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros en el que R^{N1} y R^{N3} están unidos juntos para formarlo y que puede tener un sustituyente, o

D)

X , n , R^{N1} , R^{N4} y R^{N5} representan los grupos definidos anteriormente; y R^{N2} y R^{N3} representan un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros en el que R^{N2} y R^{N3} están unidos juntos para formarlo y que puede tener un sustituyente), o

(6) la fórmula (III):



(en la que, R^{N8} y R^{N9} son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa

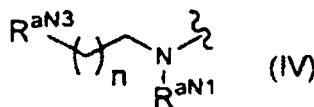
- i) un átomo de hidrógeno,
- ii) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- iii) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,
- iv) un grupo heteroarilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente
- v) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente, o
- vi) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente)).

2. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R^2 es

- 1) un átomo de hidrógeno;
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 3) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente o
- 4) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente.

3. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R^2 se representa por la siguiente fórmula (IV):

Fórmula (IV)



(en la que n representa un número entero de 0 a 4;

R^{aN1} representa

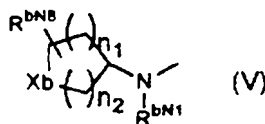
- 1) un átomo de hidrógeno o
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} ; y

R^{aN3} representa

- 1) un átomo de hidrógeno
- 2) un grupo N-alquilamino C_{1-6} ,
- 3) un grupo N,N-di-alquilamino C_{1-6} ,
- 4) un grupo etilmetilamino,
- 5) un grupo piridilo,
- 6) un grupo pirrolidin-1-ilo,
- 7) un grupo piperidin-1-ilo,
- 8) un grupo morfolin-4-ilo o
- 9) un grupo 4-metilpiperazin-1-ilo).

4. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R^2 se representa por la siguiente fórmula (V):

Fórmula (V)



(en la que n_1 y n_2 son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa un número entero de 0 a 4;

X_b representa

- 1) $-CHR^{bN4}-$,
- 2) $-NR^{bN5}-$ o
- 3) $-O-$;

R^{bN1} representa

- 1) un átomo de hidrógeno o
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} ;

ES 2 343 843 T3

R^{bN8} representa

- 1) un átomo de hidrógeno,
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} ,
- 3) un grupo arilo C_{6-14} o
- 4) un grupo aralquilo C_{7-10} ;

R^{bN4} representa

- 1) un átomo de hidrógeno,
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 3) un grupo alquilo C_{2-10} insaturado que puede tener un sustituyente,
- 4) un grupo alcoxi C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 5) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,
- 6) un grupo heteroarilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- 7) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,
- 8) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede tener un sustituyente,
- 9) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede tener un sustituyente,
- 10) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- 11) $NR^{bN6}R^{bN7}$ (en la que R^{bN6} y R^{bN7} son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-6}) o
- 12) un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente; y

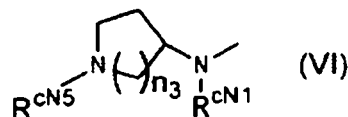
R^{bN5} es

- 1) un átomo de hidrógeno,
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 3) un grupo alquilo C_{2-10} insaturado que puede tener un sustituyente,
- 4) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,
- 5) un grupo heteroarilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente
- 6) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,
- 7) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede tener un sustituyente,
- 8) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede tener un sustituyente,
- 9) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente o
- 10) un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente).

ES 2 343 843 T3

5. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R^2 se representa por la siguiente fórmula (VI):

Fórmula (VI)



(en la que n_3 representa el número entero 1 ó 2;

R^{CN1} representa

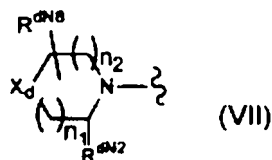
- 1) un átomo de hidrógeno o
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} ; y

R^{CN5} representa

- 1) un átomo de hidrógeno o
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} .

6. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R^2 se representa por la siguiente fórmula (VII):

Fórmula (VII)



(en la que n_1 y n_2 son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa un número entero de 0 a 4;

X_d representa

- 1) $-CHR^{dN4}-$,
- 2) $-NR^{dN5}-$ o
- 3) $-O-$; y

R^{dN2} representa

- 1) un átomo de hidrógeno o
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} ;

R^{dN8} representa

- 1) un átomo de hidrógeno,
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} ,
- 3) un grupo arilo C_{6-14} o
- 4) un grupo aralquilo C_{7-10} ;

R^{dN4} representa

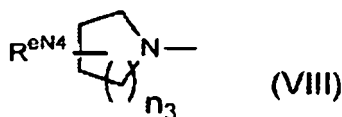
- 1) un átomo de hidrógeno,
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 3) un grupo alquilo C_{2-10} insaturado que puede tener un sustituyente,
- 4) un grupo alcoxi C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 5) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,
- 6) un grupo heteroarilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- 7) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,
- 8) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede tener un sustituyente,
- 9) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede tener un sustituyente,
- 10) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- 11) $-NR^{dN6}R^{dN7}$ (en el que R^{dN6} y R^{dN7} son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-6}) o
- 12) un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente; y

R^{dN5} representa

- 1) un átomo de hidrógeno,
- 2) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,
- 3) un grupo alquilo C_{2-10} insaturado que puede tener un sustituyente,
- 4) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,
- 5) un grupo heteroarilo de anillo de 5 a 14 miembros que puede tener un sustituyente,
- 6) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,
- 7) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede tener un sustituyente,
- 8) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede tener un sustituyente,
- 9) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente o
- 10) un grupo heterocíclico no aromático de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente).

7. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R^2 se representa por la siguiente fórmula (VIII):

Fórmula (VIII)



(en la que n_3 representa un número entero de 1 a 3; y

R^{eN4} representa

- 1) un grupo amino,

ES 2 343 843 T3

2) un grupo N-alquilamino C_{1-6} ,

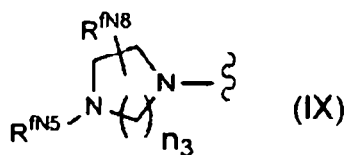
3) un grupo pirrolidin-1-ilo,

4) un grupo piperidin-1-ilo o

5) un grupo morfolin-4-ilo).

8. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R^2 se representa por la siguiente fórmula (IX):

Fórmula (IX)



(en la que n_3 representa un número entero de 1 a 3;

R^{m8} representa

1) un átomo de hidrógeno,

2) un grupo alquilo C_{1-6} ,

3) un grupo arilo C_{6-14} o

4) un grupo aralquilo C_{7-10} ; y

R^{m5} representa

1) un átomo de hidrógeno,

2) un grupo alquilo C_{1-6} que puede tener un sustituyente,

3) un grupo cicloalquilo C_{3-8} que puede tener un sustituyente,

4) un grupo heterocíclico no aromático de 3 miembros a 8 miembros que puede tener un sustituyente,

5) un grupo arilo C_{6-14} que puede tener un sustituyente,

6) un grupo heteroarilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente,

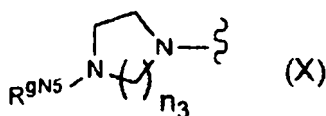
7) un grupo aralquilo C_{7-10} que puede tener un sustituyente,

8) un grupo heteroaralquilo de 5 miembros a 14 miembros que puede tener un sustituyente o

9) un grupo cicloalquilalquilo C_{4-9} que puede tener un sustituyente).

9. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R^2 se representa por la siguiente fórmula (X):

Fórmula (X)



(en la que n_3 representa un número entero de 1 a 3; y

R^{gN5} representa

- 1) un átomo de hidrógeno
- 2) un grupo alquilo C₁₋₆ que puede estar sustituido,
- 3) un grupo cicloalquilo C₃₋₈ que puede estar sustituido,
- 4) un grupo cicloalquilalquilo C₄₋₉ que puede estar sustituido,
- 5) un grupo aralquilo C₇₋₁₀ que puede estar sustituido,
- 6) un grupo piridilo que puede estar sustituido o
- 7) un grupo tetrahidropiranilo que puede estar sustituido).

10. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto representado por la fórmula (I) es un compuesto cualquiera seleccionado entre el grupo constituido por los siguientes compuestos:

- 1) (8E,12E,14E)-7-acetoxi-3,6,21-trihidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosan-8,12,14-trien-11-olida,
- 2) (8E,12E,14E)-7-((4-cicloheptilpiperazin-1-il)-carbonil)oxi-3,6,16,21-tetrahidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosan-8,12,14-trien-11-olida,
- 3) (8E,12E,14E)-3,6,16,21-tetrahidroxi-7-((4-isopropilpiperazin-1-il)carbonil)oxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosan-8,12,14-trien-11-olida y
- 4) (8E,12E,14E)-3,6,16,21-tetrahidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-7-((4-metilpiperazin-1-il)carbonil)oxi-18,19-epoxitricosan-8,12,14-trien-11-olida.

11. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende ensayar una expresión reducida de pRB, una expresión de p16 o una expresión aumentada de ciclina E midiendo los niveles de sus ARNm codificantes respectivos.

12. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el procedimiento para medir el nivel de los ARNm es un procedimiento de RT-PCR cuantitativo.

13. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el procedimiento para medir el nivel de los ARNm es un procedimiento de punta de ADN.

14. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende ensayar una expresión reducida de pRB, una expresión de p16 o una expresión aumentada de ciclina E midiendo los niveles de sus proteínas respectivas.

15. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el procedimiento para medir los niveles de sus proteínas respectivas es un procedimiento de transferencia de western.

16. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el procedimiento para medir los niveles de sus proteínas respectivas es un procedimiento de inmunohistotinción.

17. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el procedimiento para medir los niveles de sus proteínas respectivas es un procedimiento ELISA.

18. Un kit para su uso en el procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende un compuesto representado por la fórmula I y un cebador que contiene al menos 15 secuencias de bases consecutivas de los genes de pRB, p16 o ciclina E.

19. Un kit para su uso en el procedimiento de ensayo de acuerdo con las reivindicaciones 15, 16 ó 17, que comprende un compuesto representado por la fórmula I y un anticuerpo contra pRB, p16 o ciclina E.

Fig. 1

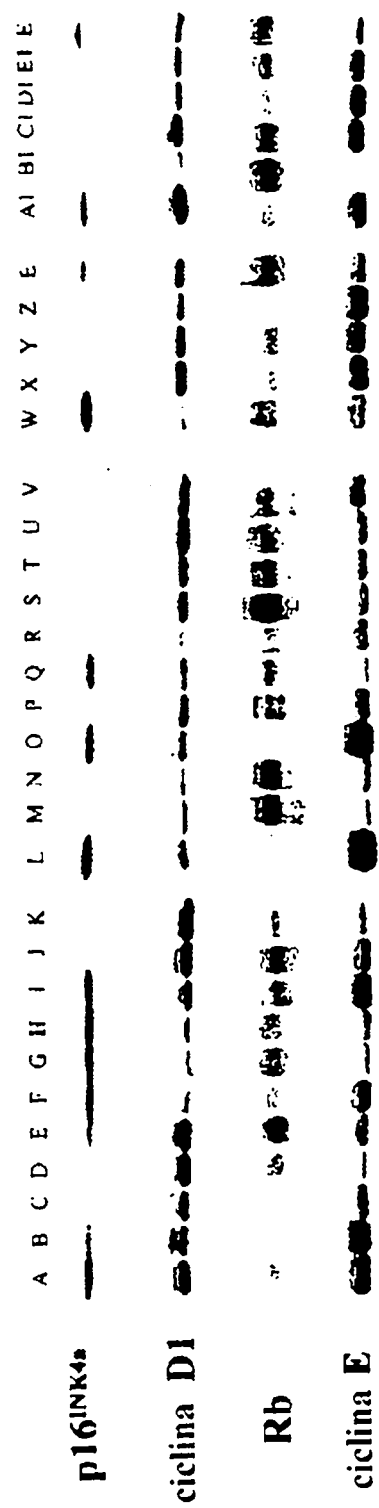


Fig. 2

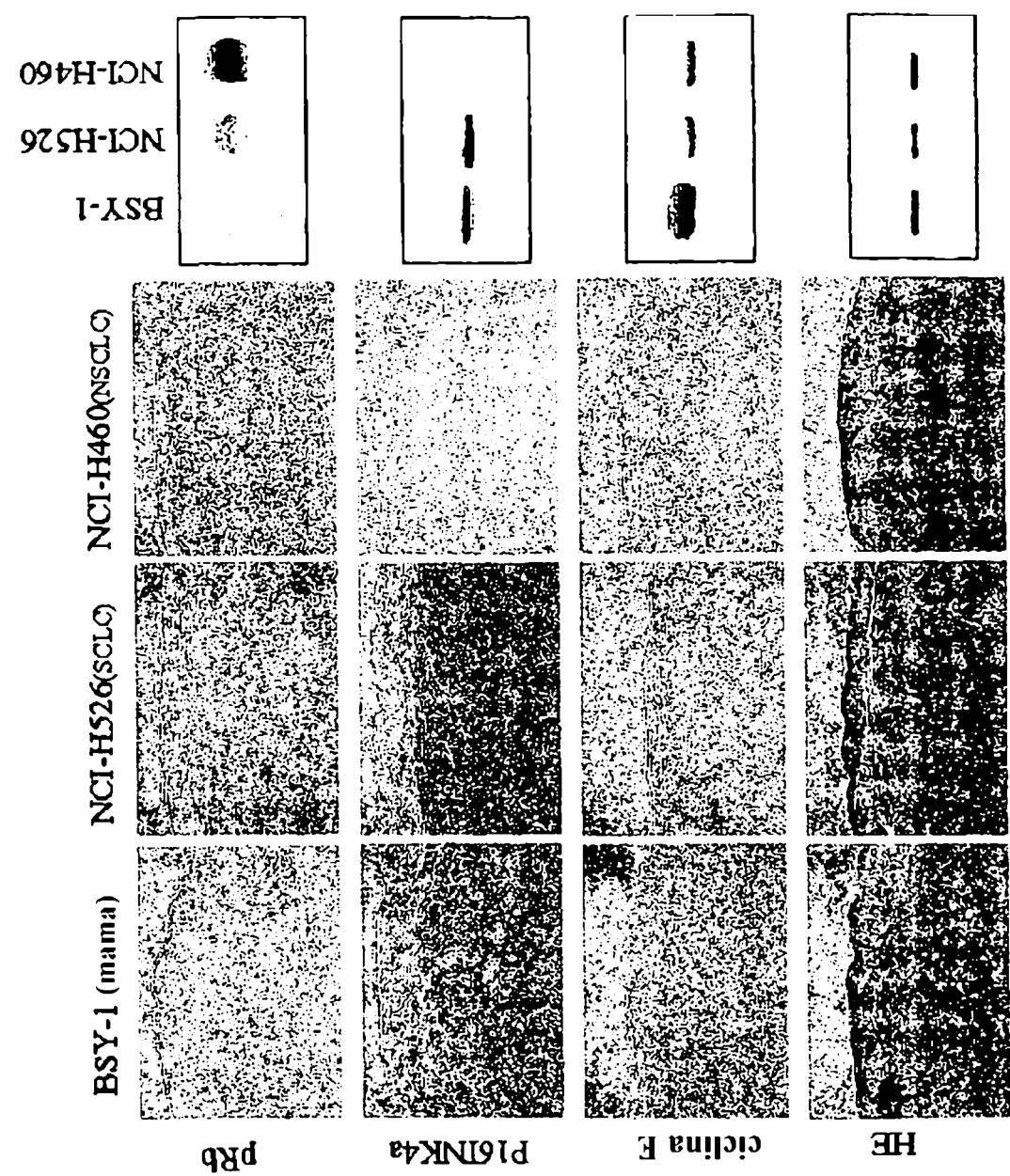


Fig. 3

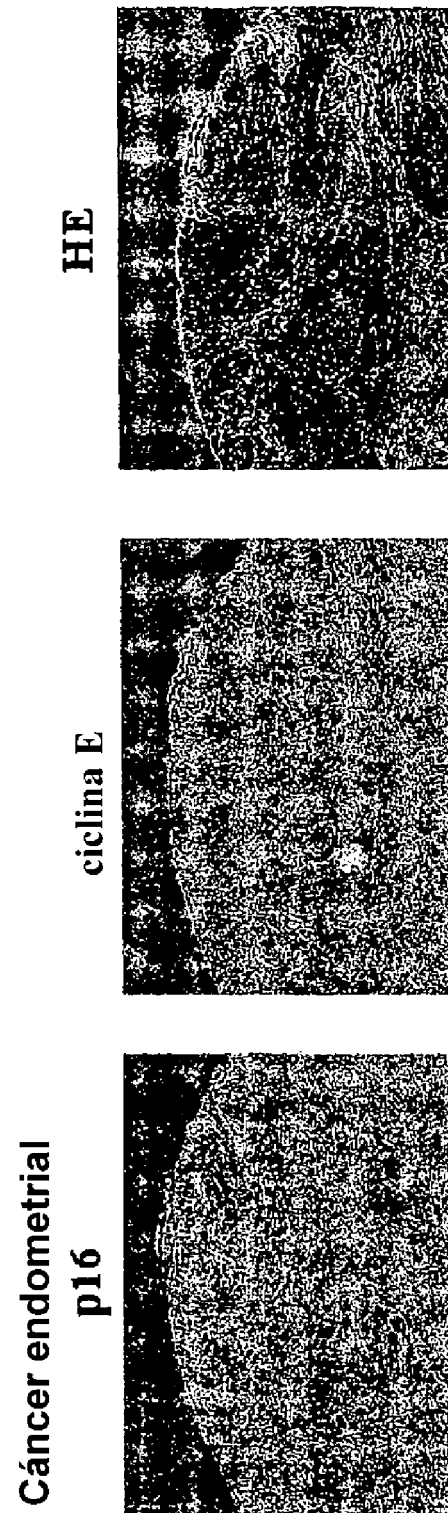


Fig. 4

