



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 349**

51 Int. Cl.:
A61K 31/11 (2006.01)
A61K 31/135 (2006.01)
A61K 31/335 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02734614 .7**
96 Fecha de presentación : **30.05.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1474121**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.2004**

54 Título: **Asociación sinérgica de (-)-gospol con docetaxel o paclitaxel para el tratamiento de cáncer.**

30 Prioridad: **30.05.2001 US 293983 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.12.2010

73 Titular/es:
The Regents of the University of Michigan
3003 S. State Street Wolverine Tower, Room 2071
Ann Arbor, Michigan 48109-1280, US
Georgetown University

72 Inventor/es: **Yang, Dajun y**
Wang, Shaomeng

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a moléculas pequeñas naturales y sintetizadas químicamente que son antagonistas de proteínas de la familia Bcl-2. En particular, la presente invención proporciona derivados de gossipol y usos médicos de derivados de gossipol como antagonistas de los efectos anti-apoptóticos de las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L especialmente en células cancerosas que sobreexpresen proteínas de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2 y/o Bcl-X_L).

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los organismos multicelulares usan un proceso denominado apoptosis para ordenar a las células dañadas o innecesarias que se destruyan a sí mismas por el bien del organismo. El control del proceso apoptótico es muy importante para el desarrollo normal del organismo, por ejemplo, el desarrollo fetal de los dedos y los pulgares requiere la eliminación controlada, mediante apoptosis, del exceso de tejidos de interconexión, y permite la formación apropiada de sinapsis neuronales en el cerebro. De forma similar, la apoptosis controlada es responsable del desprendimiento del recubrimiento interno del útero (el endometrio) en el inicio de la menstruación.

La apoptosis no sólo desempeña un papel importante en la formación de los tejidos durante el desarrollo y el mantenimiento celular normal, también es la primera defensa contra las células que suponen una amenaza al bienestar de organismos completos. Por ejemplo, en la respuesta inmune mediada por células, las células efectoras (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos o “CTLs”, de sus siglas en inglés) destruyen las células infectadas por virus induciendo la apoptosis en dichas células infectadas. Posteriormente el organismo se vale del proceso apoptótico para destruir las células efectoras cuando ya no son necesarias. La autoinmunidad se evita porque los CTLs inducen apoptosis unos en otros, e incluso en sí mismos. Los defectos en este proceso están asociados a una variedad de enfermedades autoinmunes tales como el lupus eritematoso y la artritis reumatoide.

Los organismos multicelulares también usan procesos apoptóticos para ordenar a las células con ácidos nucleicos dañados (por ejemplo, ADN) que se destruyan a sí mismas antes de volverse cancerosas. Sin embargo, algunos virus generadores de cáncer previenen la apoptosis de las células que han transformado. Por ejemplo, dos virus del papiloma humano (HPV en sus siglas en inglés) han sido implicados en la aparición de cáncer cervical debida a la supresión de la eliminación

apoptótica de las células transformadas mediante la producción de una proteína (E6) que desactiva el promotor de apoptosis p53. El virus de Epstein-Barr (EBV), el agente causante de la mononucleosis y del linfoma de Burkitt, un tumor sólido de linfocitos B, produce una proteína similar a la Bcl-2 y otra que hacen que las células transformadas aumenten la producción de Bcl-2. Ambos mecanismos hacen que las células transformadas por el virus de Epstein-Barr sean resistentes a la apoptosis, permitiendo con ello que las células cancerosas proliferen y se extiendan por todo el organismo.

Algunos cánceres que se producen por medios no víricos también han desarrollado mecanismos para evitar la destrucción por apoptosis. Las células de melanoma, por ejemplo, evitan la apoptosis inhibiendo la expresión del gen que codifica Apaf-1. Otras células cancerosas, especialmente células de cáncer de pulmón y de colon, secretan niveles elevados de moléculas señuelo solubles que se unen a FasL, inhibiendo su unión a Fas. Por tanto, los CTLs no pueden destruir estas células cancerosas. Otras células cancerosas expresan niveles altos de FasL, nuevamente, evitando la destrucción por acción de los CTLs. Otros virus manipulan la maquinaria apoptótica celular sin producir de forma directa el desarrollo de un cáncer. Por ejemplo, se cree que la destrucción del sistema inmune en individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humano (VIH) progresa a través de células T CD4⁺ infectadas (aproximadamente 1 en 100.000) que ordenan a sus células hermanas que inicien la apoptosis.

Una regulación defectuosa de la maquinaria apoptótica también ha sido implicada en varias afecciones degenerativas y enfermedades vasculares.

Es evidente que la regulación controlada del proceso apoptótico y de la maquinaria apoptótica es vital para la supervivencia de los organismos multicelulares. Habitualmente, los cambios bioquímicos que se producen en una célula a la que se ha instruido comenzar la apoptosis se producen en una procesión ordenada. Sin embargo, como se ha mostrado anteriormente, una regulación deficiente del proceso y la maquinaria apoptótica puede provocar graves efectos negativos y que aparezca una enfermedad en un organismo.

Se han producido varios intentos para controlar y restaurar la regulación de la maquinaria apoptótica en células aberrantes (por ejemplo, células cancerosas). En general, dichos intentos han tenido un éxito limitado como tratamientos para las enfermedades subyacentes caracterizadas por la regulación defectuosa de la maquinaria apoptótica por una serie de razones, tales como toxicidad, ineficacia, coste elevado, y similares. Lo que se necesita son composiciones y métodos mejorados para

regular la apoptosis en sujetos que padecen enfermedades y afecciones que se caracterizan por una regulación defectuosa del proceso apoptótico.

RESUMEN DE LA INVENCION

5 La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere a moléculas pequeñas naturales y sintetizadas químicamente que son antagonistas de proteínas de la familia Bcl-2. En particular, la presente invención proporciona derivados de gosipol y usos médicos de derivados de gosipol como antagonistas de los efectos anti-apoptóticos de las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L especialmente en células cancerosas que
10 sobreexpresen proteínas de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2 y/o Bcl-X_L).

Más específicamente, la invención proporciona el uso de (-)-gosipol en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en un sujeto, en donde se administra a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho (-)-gosipol conjuntamente con un agente anticancerígeno seleccionado del grupo que
15 consiste en docetaxel y paclitaxel.

La invención también proporciona (-)-gosipol para su uso en un método para tratar cáncer en un sujeto, en donde se administra a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho (-)-gosipol conjuntamente con un agente anticancerígeno seleccionado del grupo que consiste en docetaxel y paclitaxel.

20 La Bcl-2 es el miembro fundador de una familia de proteínas y fue aislada por primera vez como producto de un oncogén. La familia Bcl-2 de proteínas ahora incluye moléculas anti-apoptóticas tales como Bcl-2 y Bcl-X_L y moléculas pro-apoptóticas tales como Bax, Bak, Bid y Bad. Se cree que la Bcl-2 y la Bcl-X_L son importantes reguladores de la apoptosis mediada por la familia bcl-2.

25 En realizaciones relacionadas, se contempla que la administración de (-)-gosipol proporciona un tratamiento efectivo de afecciones neoplásicas y otros trastornos que implican la hiperproliferación aberrante de células (por ejemplo, células tumorales).

En otras realizaciones relacionadas, la presente invención proporciona usos
30 médicos o profilaxis de cánceres en un sujeto que comprenden la administración al sujeto de (-)-gosipol en una cantidad efectiva para inhibir Bcl-2 y/o Bcl-X_L, aumentando de este modo la supresión tumoral y/o induciendo la apoptosis. Preferiblemente, el (-)-gosipol se administra en conjunción con un agente promotor de la apoptosis de células tumorales (por ejemplo, geranilgeraniol [3,7,11,15-tetramethyl-2,6,10,14-hexadecatraen-1-ol]). La presente invención contempla que el aumento de la apoptosis
35

tumoral restablece el control apoptótico normal asociado a niveles basales de expresión de Bcl-2 y/o Bcl-X_L.

Los usos médicos de la presente invención son particularmente adecuados para el tratamiento de cánceres que se caracterizan por la sobreexpresión de proteínas de la familia Bcl-2, que incluyen la Bcl-2 y/o la Bcl-X_L, aunque sin limitarse a ellas.

En otras realizaciones preferidas, los usos médicos de la presente invención proporcionan tratamientos para una serie de afecciones que incluyen, aunque sin limitación, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, linfomas, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer de colon, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón no pequeño, carcinoma cervical, leucemia, neuroblastoma y glioblastoma, y otros similares.

En una realización preferida, la presente invención proporciona (-)-gosipol para uso en la modulación de la apoptosis en una célula que comprende: proporcionar una célula, en donde la célula sobreexpresa una proteína de la familia Bcl-2; (-)-gosipol y tratar la célula con una cantidad efectiva de (-)-gosipol en las condiciones necesarias para que la apoptosis celular se regule.

En realizaciones relacionadas, la presente invención proporciona la administración de (-)-gosipol a un paciente que padece una afección que se caracteriza por la sobreexpresión de una proteína de la familia Bcl-2. En algunas realizaciones, las proteínas de la familia Bcl-2 contempladas incluyen, aunque sin limitación, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1/BFL-1 y BOO-DIVA, Bcl-w, Bcl-6, Bcl-8 y Bcl-y, y otras similares. En algunas otras realizaciones, las proteínas de la familia Bcl-2 tienen actividad pro-apoptótica. En otras realizaciones adicionales, las proteínas de la familia Bcl-2 tienen actividad anti-apoptótica.

En algunas realizaciones, las células y tejidos enfermos son tratados con los usos médicos de la presente invención. A este respecto, varias enfermedades son susceptibles de tratamiento o profilaxis con los usos médicos de la invención. Un ejemplo no limitante de estas enfermedades incluye: cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, linfomas, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer de colon, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón no pequeño, carcinoma cervical, leucemia, neuroblastoma y glioblastoma; y otros similares. En algunas realizaciones, las células cancerosas tratadas son metastáticas.

En otra realización adicional, la presente invención se refiere a (-)-gospol para su uso en el tratamiento de un sujeto (por ejemplo, un paciente) que comprende la administración de (-)-gospol a un sujeto que sobreexpresa una proteína de la familia Bcl-2. En un ejemplo preferido de estas realizaciones, el compuesto gospol se une a una proteína de la familia Bcl-2.

Las realizaciones preferidas de la presente invención están dirigidas a proporcionar (-)-gospol para su uso en el tratamiento de un sujeto que comprende la administración de (-)-gospol y un agente anticancerígeno a un sujeto que sobreexpresa una proteína de la familia Bcl-2.

Se contempla una serie de agentes anticancerígenos para su uso en la presente invención. De hecho, la presente invención contempla, aunque sin limitación, la administración de numerosos agentes anticancerígenos tales como: agentes que inducen la apoptosis; polinucleótidos (por ejemplo, ribozimas); polipéptidos (por ejemplo, enzimas); fármacos; miméticos biológicos; alcaloides; agentes alquilantes; antibióticos antitumorales; antimetabolitos; hormonas; compuestos de platino; anticuerpos monoclonales conjugados con fármacos, toxinas y/o radionucleótidos anticancerígenos; modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo, interferones [por ejemplo, IFN- α , etc.] e interleuquinas [por ejemplo, IL-2, etc.], etc.); agentes de inmunoterapia adoptiva; factores de crecimiento hematopoyético; agentes que inducen la diferenciación de células tumorales (por ejemplo, ácido todo-trans-retinoico, etc.); reactivos de terapia génica; reactivos y nucleótidos de terapia antisentido; vacunas tumorales; e inhibidores de angiogénesis, y otros similares. Los especialistas en la técnica conocen otros numerosos ejemplos de compuestos quimioterapéuticos y de terapias contra el cáncer adecuados para la administración conjunta con los compuestos de gospol descritos.

En las realizaciones preferidas, los agentes anticancerígenos comprenden agentes que inducen o estimulan la apoptosis. Los agentes que inducen la apoptosis incluyen, aunque sin limitación, radiación (por ejemplo, UV); inhibidores de quinasa (por ejemplo, inhibidor de quinasa de Receptor de Factor de Crecimiento Epidermal [EGFR], inhibidor de quinasa de Receptor de Factor de Crecimiento Vascular [VGFR], inhibidor de quinasa de Receptor de Factor de Crecimiento de Fibroblasto [FGFR], inhibidor de quinasa de Receptor de Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas [PGFR], e inhibidores de quinasa Bcr-Abl tales como STI-571, Gleevec y Glivec); moléculas antisentido; anticuerpos [por ejemplo, Herceptin y Rituxan]; anti-estrógenos [por ejemplo, raloxifene y tamoxifen]; anti-andrógenos [por ejemplo, flutamide,

bicalutamide, finasteride, aminoglutetamide, quetoconazol y corticosteroides]; inhibidores de ciclooxigenasa 2 (COX-2) [por ejemplo, Celecoxib, meloxicam, NS-398 y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs)]; y fármacos quimioterapéuticos para el cáncer [por ejemplo, irinotecan (Camptosar), CPT-11, fludarabine (Fludara),
5 dacarbazine (DTIC), dexametasona, mitoxantrona, Mylotarg, VP-16, cisplatino, 5-FU, Doxrubicin, Taxotere o taxol]; moléculas de señalización celular; ceramidas y citoquinas; y estaurosprina, y otros similares.

En otras realizaciones adicionales, la presente invención se refiere a (-)-gosipol para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende la administración
10 de una cantidad efectiva de (-)-gosipol a un paciente que padece una afección que se caracteriza por la sobreexpresión de una proteína de la familia Bcl-2.

Otras realizaciones están dirigidas a métodos para tratar el cáncer en un sujeto que comprenden la administración a un sujeto que padece cáncer, en donde el cáncer se caracteriza por la sobreexpresión de una proteína de la familia Bcl-2, de una
15 cantidad efectiva de (-)-gosipol y un agente anticancerígeno.

Otros métodos están dirigidos al tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende: administrar a un paciente que padece cáncer, en donde el cáncer se caracteriza por la resistencia a terapias contra el cáncer (por ejemplo, quimiorresistente, resistente a la radiación, resistente a hormonas, y otros similares),
20 de una cantidad efectiva de (-)-gosipol.

En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a (-)-gosipol para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende la administración a un paciente que padece cáncer, en donde el cáncer se caracteriza por la sobreexpresión de una proteína de la familia Bcl-2, de una dosis de (-)-gosipol suficiente para inhibir la
25 actividad y/o para reducir la sobreexpresión de la proteína Bcl-2.

La presente invención también proporciona (-)-gosipol para uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende la administración a un paciente que padece cáncer, en donde el cáncer se caracteriza por la sobreexpresión de una proteína de la familia Bcl-2, de una dosis de (-)-gosipol y un agente anticancerígeno
30 que es suficiente para reducir la sobreexpresión de la proteína Bcl-2.

La presente invención también se refiere a (-)-gosipol para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende la administración a un paciente que padece cáncer, en donde dicho cáncer se caracteriza por la sobreexpresión de una proteína de la familia Bcl-2, de una dosis de (-)-gosipol suficiente para inhibir la

actividad de la proteína de la familia Bcl-2 y/o reducir la sobreexpresión de dicha proteína Bcl-2.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona (-)-gosipol para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende la administración a un
5 paciente que padece cáncer, en donde dicho cáncer se caracteriza por la sobreexpresión de una proteína de la familia Bcl-2, de una dosis de (-)-gosipol y un agente anticancerígeno que sea suficiente para inhibir la actividad de la proteína Bcl-2 y/o de reducir la sobreexpresión de dicha proteína Bcl-2.

Otras ventajas, beneficios y realizaciones preferidas de la presente invención
10 serán evidentes para el especialista en la técnica.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las siguientes figuras forman parte de la especificación y se incluyen para demostrar con mayor claridad determinados aspectos y realizaciones de la presente
15 invención. La presente invención no pretende quedar limitada a las realizaciones específicamente presentadas en dichas figuras.

La Figura 1 muestra una alineación de secuencia de Bcl-2 (SEC ID N°: 1) y Bcl-X_L (SEC ID N°: 2).

La Figura 2 muestra una representación de lazo de la estructura global de Bcl-2
20 formando complejo con el péptido Bak BH3.

La Figura 3 muestra la inhibición directa de la unión entre el péptido Bak BH3 y Bcl-2 (Bcl-XL) debida al gosipol.

La Figura 4 muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

25 La Figura 5A muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

La Figura 5B muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

La Figura 6 muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización
30 de la presente invención.

La Figura 7 muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

La Figura 8A muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

La Figura 8B muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

La Figura 9 muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

5 La Figura 10 proporciona las estructuras químicas de gosipol, gosipolona y las bases de Schiff del gosipol y la gosipolona, resultado de ensayos celulares en una realización de la presente invención.

La Figura 11 muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

10 La Figura 12 muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

La Figura 13 muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

15 La Figura 14 muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

La Figura 15A muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

La Figura 15B muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

20 La Figura 16 muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

La Figura 17 muestra los resultados de los ensayos de unión en una realización de la presente invención.

25 DEFINICIONES

Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se define una serie de términos y expresiones.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “compuesto de gosipol” se refiere a (-)-gosipol y a sales de (-)-gosipol farmacéuticamente aceptables.

30 Tal como se usa en la presente invención, la expresión “proteínas de la familia Bcl-2” se refiere tanto a los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, que incluyen aunque sin limitación Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1/BFL-1 y BOO-DIVA, Bcl-w, Bcl-6, Bcl-8 y Bcl-y, como a los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, que incluyen aunque sin limitación Bak, Bax, tBid, *Harakiri*, Bim, Bmf, así como otros miembros de BH3 (Bcl-

2 homología 3) que contienen proteínas que son reguladas por los compuestos de gosipol.

Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones “sobreexpresión de Bcl-2” o “sobreexpresión de una proteína de la familia Bcl-2” se refieren a un nivel
5 elevado (por ejemplo, aberrante) de ARNm’s que codifican para una(s) proteína(s) de la familia Bcl-2, y/o a niveles elevados de proteína(s) de la familia Bcl-2 en células o tejidos en comparación con los correspondientes células y tejidos similares normales no patológicos que expresan niveles basales de ARNm’s que codifican proteínas de la familia Bcl-2 o que tienen niveles basales de proteínas de la familia Bcl-2. Los métodos
10 para detectar los niveles de ARNm’s que codifican proteínas de la familia Bcl-2, o los niveles de proteínas de la familia Bcl-2, en una célula o en un tejido, incluyen, aunque sin limitación, métodos inmunohistoquímicos y métodos de amplificación de ácidos nucleicos.

Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones “agente anticancerígeno” o “agente anticancerígeno convencional” se refieren a cualquier
15 compuesto quimioterapéutico, terapia de radiación o intervención quirúrgica usados en el tratamiento contra el cáncer.

Tal como se usa en la presente memoria, “*in vitro*” se refiere a un entorno artificial y a procesos o reacciones que tienen lugar dentro de un entorno artificial. Los
20 entornos *in vitro* pueden consistir en, aunque sin limitación, tubos de ensayo y cultivos celulares. La expresión “*in vivo*” se refiere al entorno natural (por ejemplo, un animal o una célula) y a procesos o reacciones que tienen lugar en un entorno natural.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “célula hospedante” se refiere a cualquier célula eucariótica o procariótica (por ejemplo, células de mamífero,
25 células de ave, células de anfibio, células vegetales, células de pez y células de insecto), que se encuentren tanto *in vitro* como *in vivo*.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “cultivo celular” se refiere a cualquier cultivo *in vitro* de células. En esta definición se incluyen líneas celulares continuas (por ejemplo, con un fenotipo inmortal), cultivos celulares
30 primarios, líneas celulares finitas (por ejemplo, células no transformadas), y cualquier otra población de células mantenida *in vitro*, incluyendo ovocitos y embriones.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “sujeto” se refiere a organismos que son tratados con los métodos de la presente invención. Dichos organismos incluyen, aunque sin limitación, humanos. En el contexto de la invención,
35 el término “sujeto” generalmente se refiere a un individuo que va a recibir o que ha

recibido el tratamiento (por ejemplo, la administración de compuesto(s) de gosipol, y opcionalmente uno o más agentes anticancerígenos) para una enfermedad que se caracteriza por la sobreexpresión de proteínas de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A-1 (Bfl-1) y Boo).

- 5 El término “diagnosticado”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere al reconocimiento de una enfermedad por sus indicios y síntomas (por ejemplo, resistencia a terapias convencionales contra el cáncer), o por un análisis genético, un análisis patológico, un análisis histológico, y similar.

- 10 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “compite por la unión” se utiliza en referencia a una primera molécula (por ejemplo, un compuesto de gosipol) con una actividad que la une al mismo sustrato (por ejemplo, Bcl-2 y/o Bcl-X_L) que una segunda molécula (por ejemplo, una proteína de la familia Bcl-2 tal como Bax, Bak, Bid y Bad, etc.). La eficiencia (por ejemplo, cinética o termodinámica) de la unión por parte de la primera molécula puede ser la misma, superior o inferior a la eficiencia de la unión al sustrato por parte de la segunda molécula. Por ejemplo, la constante de equilibrio de unión (K_D) para la unión con el sustrato puede ser diferente para las dos moléculas.

- 20 Tal como se usa en la presente memoria, el término “antisentido” se usa en referencia a secuencias de ARN que son complementarias a una secuencia de ARN específica (por ejemplo, ARNm). En esta definición se incluyen las moléculas de ARN antisentido (“ARNas”) implicadas en la regulación génica en bacterias. El ARN antisentido puede producirse mediante cualquier método, que incluye la síntesis a través de división de gen(es) de interés con una orientación inversa a un promotor vírico que permite la síntesis de una cadena codificadora. Por ejemplo, una vez
- 25 introducido en un embrión, esta cadena transcrita se combina con ARNm natural producido por el embrión para formar dúplex. Estos dúplex bloquean a continuación la transcripción posterior del ARNm o su traducción. De este modo, se pueden generar fenotipos mutantes. La expresión “cadena antisentido” se usa en referencia a una cadena de ácido nucleico que es complementaria a la cadena “sentido”. La
- 30 designación (-) (es decir, “negativa”) se utiliza algunas veces para referirse a la cadena antisentido, usándose a veces la designación (+) para referirse a la cadena sentido (es decir, “positiva”). Las regiones de una secuencia de ácidos nucleicos que son accesibles a moléculas antisentido pueden determinarse usando métodos de análisis por ordenador disponibles.

El término “muestra” tal como se usa en la presente memoria se emplea en su sentido más amplio. Una muestra de la que se sospecha que indica una afección caracteriza por la sobreexpresión de una proteína de la familia Bcl-2 puede comprender una célula, un tejido o un fluido, cromosomas aislados a partir de una
5 célula (por ejemplo, una expansión de cromosomas de metafase), ADN genómico (en disolución o ligado a un soporte sólido tal como en el análisis por transferencia Southern), ARN (en disolución o ligado a un soporte sólido tal como en el análisis por transferencia Northern), ADNc (en disolución ligado a un soporte sólido) y similares. Una muestra que se sospecha que contiene una proteína puede comprender una
10 célula, una porción de un tejido, un extracto que contiene una o más proteínas, y otros similares.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos “purificado” o “purificar” se refieren a la eliminación de componentes no deseados de una muestra. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “sustancialmente purificado” se refiere a
15 moléculas, secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, que son extraídas de su entorno natural, aisladas o separadas, y que están al menos 60% libres de otros componentes con los que se asocian de forma natural, preferiblemente al menos 75% libres y más preferiblemente al menos 90% libres. Por ejemplo, un “polinucleótido aislado” es por lo tanto un polinucleótido sustancialmente purificado.

20 Tal como se usa en la presente memoria, el término “genoma” se refiere al material genético (por ejemplo, cromosomas) de un organismo o célula hospedante.

La expresión “secuencia de nucleótidos de interés” se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos (por ejemplo, ARN o ADN), cuya manipulación puede ser considerada por el especialista en la técnica como deseable por alguna razón (por
25 ejemplo, para tratar una enfermedad, conferir cualidades mejoradas, etc.). Dichas secuencias de nucleótidos incluyen, aunque sin limitación, secuencias codificadoras, o porciones de las mismas, de genes estructurales (por ejemplo, genes informadores, genes marcadores de selección, oncogenes, genes de resistencia a fármacos, factores de crecimiento, etc.), y secuencias reguladoras no codificadoras que no codifican un
30 ARNm o un producto proteico (por ejemplo, secuencia promotora, secuencia de poliadenilación, secuencia de terminación, secuencia potenciadora, etc.).

“Secuencia de ácido nucleico” y “secuencia de nucleótidos” tal como se usan en la presente memoria se refieren a un oligonucleótido o polinucleótido, y a fragmentos o porciones de los mismos, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético
35 que pueden ser cadena sencilla o doble, y que representan la cadena sentido o

antisentido. Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones “molécula de ácido nucleico que codifica”, “secuencia de ADN que codifica”, “ADN que codifica”, “secuencia de ARN que codifica” y “ARN que codifica” se refieren al orden o a la secuencia de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos a lo largo de una cadena de ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico. El orden de dichos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos determina el orden de los aminoácidos a lo largo de la cadena de polipéptido (proteína) traducida a partir del ARNm. De este modo, la secuencia de ADN o de ARN codifica para la secuencia de aminoácidos.

El término “gen” se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que comprende secuencias codificadoras necesarias para la producción de un polipéptido o precursor (por ejemplo, proinsulina). El polipéptido puede ser codificado por una secuencia codificadora de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificadora siempre que se mantenga la actividad o las propiedades funcionales deseadas (por ejemplo, la actividad enzimática, la unión de ligando, la transducción de señal, etc.) de la longitud completa o del fragmento. El término también abarca la región codificadora de un gen estructural e incluye secuencias localizadas adyacentes a la región codificadora en los extremos 5' y 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cada extremo de tal modo que el gen se corresponde con la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias que están localizadas 5' respecto de la región codificadora y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias no traducidas 5'. Las secuencias que están localizadas 3' o por debajo de la región codificadora y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término “gen” abarca la forma de ADNc y la genómica de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificadora interrumpida con secuencias no codificadoras denominadas “intrones” o “regiones intervinientes”. Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en ARN nuclear (ARNnh); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se eliminan o se extraen por división del transcrito nuclear o primario; por tanto los intrones están ausentes en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm actúa durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de aminoácidos en un polipéptido en desarrollo.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “gen exógeno” se refiere a un gen que no se encuentra presente de forma natural en un organismo o célula hospedante, o que es introducido artificialmente en un organismo o célula hospedante.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “vector” se refiere a cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmico, cromosoma, virus, virión, etc., que es capaz de replicarse cuando se asocia a los elementos de control apropiados, y que puede transferir secuencias génicas entre células. Por tanto, el término incluye vehículos de clonación y de expresión, así como vectores víricos.

Tal como se usa en la presente memoria, “expresión génica” se refiere al proceso de convertir información genética codificada en un gen en ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt o ARNsn) a través de la “transcripción” del gen (es decir, mediante la acción enzimática de una ARN polimerasa), y para genes codificadores de proteínas, en proteínas mediante la “traducción” de ARNm. La expresión génica puede regularse en muchas etapas del proceso. La “regulación al alza” o “activación” se refiere a una regulación que aumenta la producción de productos de expresión génica (es decir, ARN o proteína), mientras que “regulación a la baja” o “represión” se refiere a la regulación que disminuye la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que están implicadas en la regulación al alza o en la regulación a la baja a menudo son denominadas “activadores” y “represores”, respectivamente.

Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones “molécula de ácido nucleico que codifica”, “secuencia de ADN que codifica”, “ADN que codifica”, “secuencia de ARN que codifica” y “ARN que codifica” se refieren al orden o a la secuencia de desoxirribonucleótidos o de ribonucleótidos a lo largo de una cadena de ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico. El orden de dichos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos determina el orden de los aminoácidos a lo largo de la cadena de polipéptidos (proteína) traducidos a partir del ARNm. La secuencia de ADN o de ARN codifica de este modo para la secuencia de aminoácidos.

Los términos “homología” e “porcentaje de identidad”, cuando se usan en relación a ácidos nucleicos, se refieren a un grado de complementariedad. Puede existir una homología parcial (es decir, una identidad parcial) o una homología completa (es decir, una identidad completa). Una secuencia complementaria es aquella que inhibe al menos parcialmente una secuencia completamente complementaria para hibridarse con una secuencia diana de ácido nucleico, y se designa con la expresión funcional “sustancialmente homóloga”. La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria con la secuencia diana puede examinarse usando un ensayo de hibridación (análisis de transferencia Southern o Northern, hibridación en disolución, y otros similares) en condiciones de

baja severidad. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga (es decir, un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con otro oligonucleótido de interés) competirá e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una secuencia completamente homóloga con una secuencia diana en condiciones de baja severidad. Esto no significa que las condiciones de baja severidad sean aquellas que permiten una unión no específica; las condiciones de baja severidad requieren que la unión de dos secuencias una con la otra sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica puede evaluarse a través del uso de una segunda diana que carezca incluso de un grado parcial de complementariedad (por ejemplo, inferior a aproximadamente el 30% de identidad); en ausencia de unión no específica la sonda no se hibridará con la segunda diana no complementaria.

Tal como se usa en la presente memoria el término “severidad” se usa en referencia a las condiciones de temperatura, fuerza iónica y de presencia de otros compuestos tales como disolventes orgánicos, bajo las cuales se llevan a cabo hibridaciones de ácido nucleico. En condiciones de “alta severidad”, el emparejamiento de bases de ácido nucleico sólo se producirá entre fragmentos de ácido nucleico que tengan una elevada frecuencia de secuencias base complementarias. Por tanto, a menudo se requieren condiciones de severidad “débil” o “baja” con ácidos nucleicos que derivan de organismos que son genéticamente diversos, ya que la frecuencia de secuencias complementarias habitualmente es menor. Aunque la presente invención puede llevarse a cabo utilizando condiciones de baja severidad, en una realización preferida se emplean condiciones de severidad media o alta.

Las “condiciones de alta severidad”, cuando se usa en referencia a la hibridación de ácido nucleico, comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C (por ejemplo, durante una noche) en una disolución que consiste en 5X SSPE (43,8 g/L de NaCl, 6,9 g/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 1,85 g/L de EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), 0,5% de SDS, 5X reactivo de Denhardt [50X de Denhardt contiene por cada 500 mL, 5 g de Ficoll (Tipo 400, Pharmacia), 5 g de BSA (Fraction V; Sigma)], 100 µg/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y formamida al 50% (V/V). Las muestras de ADN hibridado se lavan a continuación dos veces en una disolución que comprende 2 X SSPE, 0,1% de SDS a temperatura ambiente, seguido de 0,1X SSPE, 1,0% de SDS a 42°C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. En la técnica se conocen condiciones que promueven la hibridación en condiciones de alta severidad (por ejemplo, aumentar

la temperatura de la hibridación y/o de las etapas de lavado, usar formamida en la disolución de hibridación, etc.).

Las “condiciones de severidad media” cuando se usan en referencia a la hibridación de ácido nucleico comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42°C en una disolución que consiste en 5X SSPE (43,8 g/L de NaCl, 6,9 g/L de NaH₂PO₄ H₂O y 1,85 g/L de EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), 0,5% de SDS, 5X reactivo de Denhardt [50X de Denhardt contiene por cada 500 mL, 5 g de Ficoll (Tipo 400, Pharmacia), 5 g de BSA (Fraction V; Sigma)], 100 µg/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y formamida al 50% (V/V), seguido de un lavado en una disolución 1 X SSPE, 1,0% de SDS a temperatura ambiente, seguido de 2X SSPE, 0,1% de SDS a 42°C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

Las “condiciones de severidad baja” comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42°C en una disolución que consiste en 5X SSPE (43,8 g/L de NaCl, 6,9 g/L de NaH₂PO₄ H₂O y 1,85 g/L de EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), 0,1% de SDS, 5X reactivo de Denhardt [50X de Denhardt contiene por cada 500 mL, 5 g de Ficoll (Tipo 400, Pharmacia), 5 g de BSA (Fraction V; Sigma)], 100 µg/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y formamida al 50% (V/V), seguido del lavado en una disolución que comprende 5X SSPE, 0,1% de SDS a 42°C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. Adicionalmente, en la técnica es bien conocido que se pueden emplear múltiples condiciones equivalentes para alcanzar condiciones de baja severidad; se consideran factores tales como la longitud y la naturaleza (ADN, ARN, composición en bases) de la sonda y la naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición en bases, presente en disolución o inmovilizada, etc.) y la concentración de sales y otros componentes (por ejemplo, la presencia o la ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol), y la disolución de hibridación puede variar para generar condiciones de hibridación de baja severidad diferentes a las condiciones enumeradas antes, aunque equivalentes a ellas.

Cuando se usan en referencia a la secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla, la expresión “sustancialmente homóloga” se refiere a cualquier sonda que pueda hibridarse (es decir, que sea complemento) con una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla en condiciones de baja severidad tal como se ha descrito antes. Un gen puede producir múltiples especies de ARN que son generadas por la división diferencial del transcrito de ARN primario. Los ADNc's que son variantes de

división del mismo gen contendrán regiones de identidad de secuencia o de homología completa (que representa la presencia del mismo exón o porción del mismo exón en ambos ADNc's) y regiones de completa falta de identidad (por ejemplo, que representan la presencia de un exón "A" en el ADNc 1 mientras que el ADNc 2
5 contiene un exón "B" en su lugar). Debido a que ambos ADNc's contienen regiones de identidad de secuencia, ambos se hibridarán con una sonda derivada de un gen entero o de porciones del gen que contiene las secuencias encontradas en ambos ADNc's; por lo tanto las dos variantes de división son sustancialmente homólogas con respecto a dicha sonda y la una respecto a la otra. La presente invención no está limitada por la
10 posición en la que se produzca la hibridación sólo entre secuencias completamente homólogas. En algunas realizaciones, la hibridación se produce con secuencias sustancialmente homólogas.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "proteína de interés" se refiere a una proteína codificada por un ácido nucleico de interés.

15 Tal como se usa en la presente memoria, el término "nativo" (o variante natural) cuando se usa en referencia a una proteína, se refiere a proteínas codificadas por ácidos nucleicos parcialmente homólogos, de tal modo que la secuencia de aminoácidos de las proteínas varía. Tal como se usa en la presente memoria, el término "variante" abarca proteínas codificadas por genes homólogos que tienen
20 sustituciones de aminoácidos conservativas y no conservativas que no producen un cambio en la función de la proteína, así como proteínas codificadas por genes homólogos que tienen sustituciones de amino ácidos que provocan una función proteica disminuida (por ejemplo, mutaciones nulas) o una función proteica aumentada.

25 La expresión "análisis de transferencia Northern inverso" tal como se usa en la presente memoria se refiere al análisis de ADN mediante electroforesis de ADN sobre geles de agarosa para fraccionar el ADN en función del tamaño, seguido de una transferencia del ADN fraccionado desde el gel hasta un soporte sólido, tal como nitrocelulosa o una membrana de nylon. El ADN inmovilizado se evalúa a continuación
30 con una sonda de oligo-ribonucleótido marcada o con una sonda de ARN para detectar especies de ADN complementarias a la sonda rbo usada.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "patógeno" se refiere a un agente biológico que provoca un estado de enfermedad (por ejemplo, una infección, un cáncer, etc.) en un hospedante. "Patógeno" incluye, aunque sin limitación, virus,
35 bacterias, arqueas, hongos, protozoos, micoplasma y organismos parasitarios.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “organismo” se emplea para referirse a cualquier especie o tipo de microorganismo, incluyendo, aunque sin limitación, bacterias, arqueas, hongos, protozoos, micoplasma y organismos parasitarios. Tal como se usa en la presente memoria, el término “hongo” se usa en referencia a organismos eucarióticos tales como los mohos y las levaduras, incluyendo los hongos dimórficos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “virus” se refiere a agentes infecciosos, los cuales con determinadas excepciones no son observables mediante microscopio óptico, carecen de metabolismo independiente y son capaces de replicarse únicamente dentro de una célula hospedante viva. Las partículas individuales (es decir, los viriones) consisten en ácido nucleico y una cubierta o recubrimiento proteico; algunos viriones también presentan una membrana que contiene lípidos. El término “virus” abarca todos los tipos de virus, que incluyen virus animales, vegetales, fagos y otros.

Los términos “bacterias” y “bacteria” se refieren a todos los organismos procarióticos, que incluyen aquellos phyla del Reino Procarionte. Se pretende que el término abarque todos los microorganismos considerados como bacterias que incluyen Micoplasma, Clamidia, Actinomices, Estreptomices y Rickettsia. Todas las formas de bacterias se incluyen dentro de esta definición que incluye cocos, bacilos, espirochetes, esferoblastos, protoplastos, etc. También se incluyen en este término los organismos procarióticos que son gram negativo o gram positivo. “Gram negativo” y “gram positivo” se refieren a resultados de tinción con el proceso de tinción Gram que es bien conocido en la técnica. (Véase, por ejemplo, Finegold y Martin, Diagnostic Microbiology, 6ª ed., CV Mosby St. Louis, páginas 13-15). Las “bacterias Gram positivas” son bacterias que retienen el primer colorante usado en la tinción Gram, lo que hace que las células teñidas aparezcan de color azul oscuro a púrpura al microscopio. Las “bacterias Gram negativas” no retienen el colorante primario usado en la tinción Gram, sino que son teñidas por la contra-tinción. Por tanto, las bacterias gram negativas aparecen de color rojo.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “proteína de unión a antígeno” se refiere a proteínas que se unen a un antígeno específico. Las “proteínas de unión a antígeno” incluyen, aunque sin limitación, inmunoglobulinas, que incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla y humanizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ y bibliotecas de expresión Fab. Se usan varios procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos

policlonales. Para la producción de anticuerpos se pueden inmunizar varios animales hospedantes mediante inyección con el péptido correspondiente al epítipo deseado, que incluye aunque sin limitación conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. En una realización preferida, el péptido se conjuga con un vehículo inmunogénico (por ejemplo, toxoide de difteria, albúmina de suero bovino (BSA), o hemocianina de lapa de cerradura [KLH]). Se usan varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedante, que incluyen aunque sin limitación adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias superficialmente activas tales como lisolecitina, pluronic, polioles, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa de cerradura, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (Bacilo Calmette-Guerin) y *corinebacterium parvum*.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede usar cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Estos incluyen, aunque sin limitación, la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Köhler y Milstein (Köhler y Milstein, *Nature*, 256: 495-497), así como la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana (véase, por ejemplo, Kozbor y col., *Immunol. Today*, 4: 72), y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96).

De acuerdo con la invención, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de EE.UU. 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos según se desee. Una realización adicional de la invención utiliza las técnicas conocidas en la técnica para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse y col., *Science*, 246: 1275-1281) para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

Los fragmentos de anticuerpos que contienen el idiotipo (región de unión del antígeno) de la molécula de anticuerpo pueden generarse empleando técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, aunque sin limitación: el fragmento F(ab')₂ que puede producirse mediante digestión en pepsina de una molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab' que pueden generarse reduciendo los

puentes de disulfuro de un fragmento F(ab')₂, y los fragmentos Fab que pueden generarse tratando una molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

Los genes que codifican proteínas de unión pueden aislarse empleando métodos conocidos en la técnica. En la producción de anticuerpos, el escrutinio del anticuerpo deseado puede llevarse a cabo empleando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunsorbente ligado a enzima), inmunoensayos “sándwich”, ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando marcas de oro coloidal, enzimas o radioisótopos, por ejemplo), análisis de transferencia Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación de gel, ensayos de hemaglutinación, etc.), ensayos de fijación de complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc.) etc.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “instrucciones para administrar dicho compuesto de gossipol a un sujeto” incluye las instrucciones para usar las composiciones contenidas en el kit para el tratamiento de afecciones que se caracterizan por la sobreexpresión de una proteína de la familia Bcl-2 en una célula o tejido. La expresión también se refiere a instrucciones para usar las composiciones contenidas en el kit para tratar cánceres que se caracterizan por ser resistentes al menos a una terapia anticáncer convencional (por ejemplo, quimioterapia). En determinadas realizaciones, las instrucciones además comprenden un enunciado con las dosis recomendadas o habituales de las composiciones contenidas dentro del kit a 21 CFR §201 *et seq.* En la página web de Internet de la U.S. FDA se dispone de información adicional relativa al etiquetado y los requisitos de instrucciones aplicables a los métodos y composiciones de la presente invención.

La expresión “compuesto de ensayo” se refiere a cualquier entidad química, producto farmacéutico, fármaco y similar, que puede usarse para tratar o prevenir una enfermedad, malestar o trastorno de la función corporal, o en caso contrario alterar el estatus fisiológico o celular de una muestra (por ejemplo, el nivel de proteínas de la familia Bcl-2 en una célula). Los compuestos de ensayo comprenden compuestos terapéuticos conocidos y potenciales. Se puede determinar que un compuesto de ensayo es terapéutico usando los métodos de escrutinio de la presente invención. Un “compuesto terapéutico conocido” se refiere a un compuesto terapéutico del que se ha demostrado (por ejemplo, mediante ensayos con animales o experimentos previos de administración a humanos) que es efectivo en dicho tratamiento o prevención. En las

realizaciones preferidas, los “compuestos de ensayo” son agentes anticancerígenos. En las realizaciones particularmente preferidas, los “compuestos de ensayo” son agentes anticancerígenos que inducen apoptosis en las células.

5 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “tercera parte” se refiere a cualquier entidad implicada en la venta, mantenimiento, distribución u ofrecimiento para la venta de un compuesto de ensayo contemplado para ser administrado conjuntamente con un compuesto de gosipol para tratar condiciones que se caracterizan por la sobreexpresión de proteínas de la familia Bcl-2.

10 Tal como se usa en la presente memoria, el término “modular” se refiere a la actividad de un compuesto (por ejemplo, un compuesto de gosipol) para afectar (por ejemplo, promover o retardar) un aspecto de la función celular, que incluye, aunque sin limitación, el crecimiento, la proliferación y la apoptosis de las células, y otras similares.

15 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA INVENCION

El gosipol es un compuesto bifenólico doble natural derivado del aceite de semilla de algodón sin refinar (*Gossypium sp.*). Los usos humanos del gosipol como anticonceptivo masculino han demostrado la seguridad de una administración a largo plazo de estos compuestos. Se ha demostrado que el gosipol es bien tolerado por 20 humanos y que tiene una velocidad de respuesta baja pero mensurable en pacientes con glioma recurrente fuertemente pretratados con mala prognosis.

La presente invención se define en las reivindicaciones y proporciona *datos in vivo* que demuestran que los compuestos de gosipol inhiben significativamente el crecimiento antitumoral, pero que en algunas realizaciones los compuestos de gosipol 25 alcanzan una inhibición aún mayor del crecimiento tumoral cuando se usan en combinación (administración conjunta) con uno o más agentes anticancerígenos convencionales (por ejemplo, docetaxel). Por consiguiente, en las realizaciones preferidas los compuestos de gosipol, y sus metabolitos, enantiómeros y derivados, son administrados a pacientes que padecen enfermedades que se caracterizan por la 30 sobreexpresión de Bcl-2 y/o Bcl-X_L (por ejemplo, cáncer). El gosipol induce la apoptosis en células cancerosas que expresan niveles elevados de Bcl-2 y/o Bcl-X_L, pero el gosipol tiene poco efecto sobre células con niveles bajos de expresión de Bcl-X_L y/o Bcl-2.

El gosipol es un conocido inhibidor de la espermatogénesis que puede 35 administrarse oralmente con pocos efectos secundarios. Algunos investigadores han

demostrado, sin embargo, que una administración prolongada de gosipol puede producir hipokalemia. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los presentes métodos y composiciones comprenden además la administración conjunta de suplementos de potasio a los pacientes tratados con compuestos de gosipol.

5 El gosipol ha sido estudiado como agente terapéutico anticancerígeno desde los años 1980s en modelos *in vitro* e *in vivo*. Antes de la presente invención, sin embargo, los mecanismos de los efectos anticancerígenos del gosipol no se conocían. El presente descubrimiento de que el gosipol es un potente inhibidor de Bcl-2 y Bcl-X_L demuestra que la actividad antitumoral del gosipol se debe, al menos parcialmente, a
10 la inhibición de la actividad anti-apoptótica de Bcl-2 y Bcl-X_L y de la subsiguiente inducción de apoptosis en células cancerosas que expresan niveles elevados de proteínas de la familia Bcl-2. Por tanto, la presente invención proporciona composiciones y métodos para tratar sujetos que se caracterizan por una sobreexpresión de una proteína de la familia Bcl-2.

15 En los ensayos clínicos realizados hasta la fecha, el gosipol ha demostrado una baja toxicidad en los pacientes. En algunas realizaciones, se ha contemplado que los compuestos de gosipol proporcionen un tratamiento eficaz de agente único para cánceres metastáticos. La presente invención además contempla que los compuestos de gosipol representan nuevas clases de agentes anticancerígenos que son
20 antagonistas específicos de los efectos anti-apoptóticos de Bcl-2 y Bcl-X_L.

La Bcl-2 es el miembro fundador de una familia de proteínas que incluye moléculas anti-apoptóticas (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1/BFL-1 y BOO-DIVA, Bcl-w, Bcl-6, Bcl-8 y Bcl-y y otras similares) y moléculas pro-apoptóticas (por ejemplo, Bax, Bak, Bid y Bad, y otras similares). El gen *bcl-2* es un proto-oncogén humano
25 localizado en el cromosoma 18. El gen *bcl-2* se descubrió como una posición traslocalizada en una leucemia de células B. Dicha traslocalización también se da en algunos linfomas de células B. En células B cancerosas, la porción del cromosoma 18 que contiene la posición *bcl-2* sufre una traslocalización recíproca con la porción del cromosoma 14 que contiene las cadenas pesadas del anticuerpo. Esta traslocalización
30 t(14;18) coloca el gen *bcl-2* cerca del potenciador génico de cadena pesada. El producto del gen *bcl-2*, la proteína Bcl-2, es una proteína de membrana integral que se encuentra en las membranas del retículo endoplasmático (RE), en la envoltura nuclear y en la membrana exterior de las mitocondrias. Se contempla que la Bcl-2, y la Bcl-X_L, actúan como antagonistas cruciales de la apoptosis.

Aunque no es necesario conocer el mecanismo para llevar a cabo la presente invención, y la presente invención no está limitada a ello, se contempla que las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L suprimen la apoptosis formando heterodímeros con los miembros de la familia Bcl-2 pro-apoptóticos tales como Bak, Bad, Bax, Mtd (Bok), Bim, Hrk (DP5), Blk, Bnip3, Bnip3L, y Diva. Se cree que otros miembros anti-apoptóticos (o proteínas relacionadas) de la familia Bcl-2 incluyen, aunque sin limitación, Mcl-1, A1/BFL-1 y BOO-DIVA, Bcl-w, Bcl-6, Bcl-8 y Bcl-y.

En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a proteínas que contienen el dominio BH3 como dianas para la inhibición. Debería entenderse que cuando la especificación se refiere a familias Bcl-2 de proteínas, la misma descripción pertenece a proteínas que contienen dominio BH3. Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones y métodos para la regulación de afecciones biológicas relacionadas con la expresión aberrante de proteínas que contienen dominio BH3.

La Bcl-2 y la Bcl-X_L son proteínas altamente homólogas. Muchas formas de cánceres humanos (por ejemplo, leucemia mieloide y cáncer de mama) sobreexpresan Bcl-2 y/o Bcl-X_L. Se ha descubierto que tanto la Bcl-2 como la Bcl-X_L están sobreexpresadas en cánceres de mama humanos. En particular, la Bcl-2 se ha encontrada sobreexpresada en el 60-80% de los cánceres de mama humanos. La expresión de Bcl-2 está altamente relacionada con el cáncer de mama receptor de estrógeno (RE) positivo. La Bcl-X_L está sobreexpresada en el 40-70% de los cánceres de mama humanos, el 30-60% de los cánceres de próstata, el 80% de los linfomas de células B, el 90% de los adenocarcinomas colorrectales, y muchas otras formas de cáncer. La Bcl-X_L se encuentra fundamentalmente en el cáncer de mama RE negativo. La expresión de Bcl-X_L se correlaciona típicamente con una mala prognosis y una baja tasa de supervivencia.

Varias evidencias indican que la Bcl-2 y la Bcl-X_L no sólo contribuyen a la progresión del cáncer, sino que también confieren resistencia del cáncer a la apoptosis inducida por las terapias anticancerígenas convencionales. Unos niveles elevados de Bcl-2 intracelular protege a las células (por ejemplo, a células cancerosas) de ser destruidas por apoptosis. La mayoría de los tumores sólidos están protegidos por al menos una de las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas. La mayor parte de los agentes quimioterapéuticos anticancerígenos disponibles actualmente están dirigidos contra la integridad o la replicación del ADN celular, y activan indirectamente la apoptosis en

células tumorales. Los cánceres que expresan niveles elevados de Bcl-2 y/o Bcl-X_L a menudo son resistentes frente a agentes quimioterapéuticos o terapia de radiación.

Sin embargo, los modelos de expresión de la Bcl-2 y la Bcl-X_L son diferentes en algunos cánceres que sobreexpresan las proteínas de la familia Bcl-2. Varios estudios
5 sugieren que la expresión de proteínas Bcl-2 o Bcl-X_L es suficiente para que las células cancerosas muestren una resistencia mediada por la familia Bcl-2 frente a quimioterapia o terapia con radiación. (Véase, J.C. Reed, Pharmacology, 41: 501-553; J.C. Reed y col., J. Cell Biochem., 6: 23-32 [1996]). Investigaciones adicionales sugieren que algunas células cancerosas son capaces de cambiar de sobreexpresión de Bcl-2 a Bcl-X_L. (Véase, Z. Han y col., Cancer Res., 56: 621-628). Por consiguiente,
10 algunas realizaciones de la presente invención están relacionadas con la administración de una cantidad terapéutica de uno o más antagonistas de Bcl-2 (por ejemplo, moléculas pequeñas) a pacientes que padecen un cáncer caracterizado por la sobreexpresión de Bcl-2. De forma similar, otras realizaciones de la presente invención están relacionadas con la administración de una cantidad terapéutica de uno
15 o más antagonistas de Bcl-X_L (por ejemplo, moléculas pequeñas) a pacientes que tienen un cáncer caracterizado por la sobreexpresión de Bcl-X_L. En otras realizaciones adicionales, la presente invención está relacionada con la administración de una combinación de dos o más antagonistas de familia Bcl-2 (por ejemplo, moléculas
20 pequeñas) a un paciente que padece un cáncer caracterizado por la sobreexpresión de proteínas de la familia Bcl-2. La presente invención contempla además proporcionar composiciones y métodos que comprenden uno o más antagonistas de proteína(s) de la familia Bcl-2 (por ejemplo, una proteína anti-apoptótica de la familia Bcl-2) y uno o más agentes anticancerígenos adicionales (por ejemplo, taxol,
25 docetaxel, etc.).

La investigación sobre las estructuras tri-dimensionales (3D) de la Bcl-2 y la Bcl-X_L mostró que ambas moléculas tienen un bolsillo de unión hidrofóbico (denominado bolsillo de unión BH3), que es importante para sus efectos anti-apoptóticos. Investigaciones adicionales demostraron que la Bak, la Bad y la Bax
30 tienen un dominio de unión (denominado dominio de unión BH3) que permite a la molécula unirse a los bolsillos BH3 de la Bcl-2 y la Bcl-X_L. En particular, se han determinado las estructuras 3D experimentales de alta resolución de la Bcl-X_L (S.W. Muchmore y col., Nature, 381: 335-341; y M. Aritomi y col., J. Biol. Chem., 272: 27886-27892) sola y formando un complejo con un péptido BH3 de Bak (dominio 3 de
35 homología a Bcl-2) (S. Michael y col., Science, 275: 983-986). La Bcl-2 y la Bcl-X_L

comparten un elevado grado de homología en sus secuencias de aminoácidos (45% de identidad y 56% de similitud). Se ha demostrado que cuando existe una identidad de secuencia superior al 30% entre la proteína diana (Bcl-2) y la proteína plantilla (Bcl-X_L), los métodos computacionales actuales de modelización de homología, tales como

5 MODELLER (A. Sali y col., Structure, Function, and Genetics, 23: 318-326) proporcionan una estructura 3D precisa para la proteína diana. (Véase, A. Sali, Curr. Opin. Biotech., 6: 437-451). Por tanto, en las realizaciones preferidas de la presente invención, se usa modelización computacional de homología para modelar la estructura 3D de la Bcl-2 (la proteína diana) en base a las coordinadas estructurales

10 3D experimentales de la Bcl-X_L (la proteína plantilla).

El análisis estructural 3D mediante RMN de alta resolución del gosipol acomplejado con Bcl-X_L revela que el gosipol también se une a la Bcl-X_L a través del bolsillo de unión BH3. Métodos empíricos de ensayo basados en la estructura revelaron que el gosipol, y sus enantiómeros, son potentes inhibidores de los efectos

15 anti-apoptóticos de la Bcl-X_L y, en menor medida, de los efectos anti-apoptóticos de la Bcl-2.

Por tanto, la inhibición de la función anti-apoptótica de Bcl-2/Bcl-X_L representa una novedosa y prometedora estrategia para superar la resistencia de algunos cánceres frente a la quimioterapia o la radioterapia.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere a moléculas pequeñas naturales o sintetizadas químicamente que son antagonistas de las proteínas de la familia Bcl-2. En particular, la presente invención se refiere a (-)-gosipol

25 como antagonista de los efectos anti-apoptóticos de las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L, especialmente en cánceres que sobreexpresan las proteínas de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2 y/o Bcl-X_L). Los ejemplos de composiciones y usos médicos de la presente invención se describen con más detalle en las siguientes secciones: I. Actividad de unión de Bcl-2 y Bcl-X_L; II. Estrategia basada en la estructura para el descubrimiento de inhibidores de molécula pequeña de Bcl-2 y Bcl-X_L; III.

30 Caracterización de la familia Bcl-2 de proteínas en líneas de células cancerosas; IV. El gosipol inhibe el crecimiento y la proliferación de células cancerosas; V. Mecanismo propuesto para la actividad del gosipol; VI. Actividad del gosipol en ratones de xenoinjerto MDA-231 solo y en combinación con agentes anticancerígenos

35 convencionales; VII. Agentes terapéuticos combinados o administrados conjuntamente

con gosipol; y VIII. Formulaciones farmacéuticas, vías de administración y consideraciones sobre la dosificación.

Más específicamente, la invención proporciona el uso de (-)-gosipol en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en un sujeto, en donde se administra a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho (-)-gosipol conjuntamente con un agente anticancerígeno seleccionado del grupo que consiste en docetaxel y paclitaxel.

La invención también proporciona (-)-gosipol para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto, en donde se administra a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho (-)-gosipol conjuntamente con un agente anticancerígeno seleccionado del grupo que consiste en docetaxel y paclitaxel.

I. Actividad de unión de Bcl-2 y Bcl-X_L

Aunque no se necesita comprender el mecanismo para llevar a la práctica la presente invención, y la presente invención no está limitada por ello, se contempla que los efectos anti-apoptóticos de las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L se atribuye, al menos en parte, a su capacidad para heterodimerizarse con los miembros de la familia Bcl-2 pro-apoptóticos tales como Bak, Bax y Bad. Las estructuras experimentales de Bcl-2 y Bcl-X_L demostraron que los dominios BH1 (dominio 1 de homología a Bcl-2), BH2 y BH3 de la Bcl-2 y la Bcl-X_L forman un bolsillo de unión hidrofóbico (el bolsillo de unión a BH3) en el cual se une el dominio BH3 de Bak o Bad. (Véase por ejemplo, S.W. Muchmore y col., Nature, 381: 335-341; M. Aritomi y col., J. Biol. Chem., 272: 27886-27892; S. Michael y col., Science, 275: 983-986; y A.M. Petros y col., Protein Sci., 9: 2528-2534; y A.M. Petros y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 3012-3017). Este bolsillo de unión en Bcl-2/Bcl-X_L es esencial para la función anti-apoptótica. (Véase, por ejemplo, X.M. Yin y col., Nature, 369, 321-323; S.C. Cosulich y col., Curr. Biol., 7: 913-920; S. Michael y col., ver anterior; y A.M. Petros y col., ver anterior). Por tanto, la presente invención contempla que moléculas pequeñas que se unen al sitio de unión BH3 en la Bcl-2 y/o la Bcl-X_L son capaces de bloquear la hetero-dimerización de Bcl-2 y/o Bcl-X_L con los miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2 (por ejemplo, Bad, Bak y Bax, etc.) de tal modo que la función anti-apoptótica de Bcl-2 y/o Bcl-X_L se ve antagonizada y se induce la apoptosis en células con sobreexpresión de Bcl-2 y/o Bcl-X_L. En las realizaciones preferidas, la presente invención proporciona antagonistas de molécula pequeña que se unen a el(los) bolsillo(s) de unión (por ejemplo, BH3) de Bcl-2 y/o Bcl-X_L. En algunas de estas realizaciones, la presente

invención además proporciona uno o más agentes anticancerígenos adicionales (por ejemplo, taxol, docetaxel, y otros similares) administrados en combinación con los inhibidores de molécula pequeña descritos (por ejemplo, compuestos de gosipol) de Bcl-2 y/o Bcl-X_L. En las realizaciones particularmente preferidas, los compuestos de gosipol se administran en combinación con al menos un agente anticancerígeno que induce la apoptosis.

La presente invención contempla que los inhibidores de molécula pequeña de la Bcl-2 y la Bcl-X_L presentan varias ventajas respecto a otros antagonistas de proteína disponibles comercialmente tales como oligonucleótidos, anticuerpos y péptidos antisentido, que incluyen, aunque sin limitación, una mejor disponibilidad oral, una mejor estabilidad y un menor coste.

II. Estrategia basada en la estructura para el descubrimiento de inhibidores de molécula pequeña de Bcl-2 y Bcl-X_L

La presente invención usó una potente metodología de escrutinio virtual basada en la estructura para identificar antagonistas de molécula pequeña de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, tales como Bcl-2 y Bcl-X_L, a partir de bases de datos químicas 3D de gran tamaño. Esta estrategia usa métodos de alojamiento computacional para identificar inhibidores de molécula orgánica pequeña potenciales que se unan a los sitios de unión de las proteínas diana (por ejemplo, BH3 en Bcl-2 y Bcl-X_L). En una realización, la proteína Bcl-X_L fue tratada usando la aproximación de átomo unido en los estudios de alojamiento. Solo se añadieron hidrógenos polares a la proteína, y se asignaron cargas parciales de átomo unido de Kollman. Se eliminaron todas las moléculas de agua. Se asignaron los parámetros de solvatación atómica y los volúmenes fragmentales a los átomos de proteína usando la utilidad AutoDock, AddSol (véase, página web AutoDock; G. Morris y col., J. Computational Chemistry, 19: 1639-1662).

En otra realización, se modeló la estructura 3D de la Bcl-2 con el método de modelización de homología MODELLER. (A. Sali y col., Structure, Function, and Genetics, 23: 318-326; y A. Sali, Curr. Opin. Biotech., 6: 437-451). El alineamiento de secuencia obtenido usando el programa BLAST entre Bcl-2 y Bcl-X_L se muestra en la Figura 1 y se usó en la modelización de homología de la presente invención. Puesto que el péptido BH3 de Bak se une a Bcl-2 y Bcl-X_L con buenas afinidades (Véase, J.L. Wang y col., Cancer Res., 60: 1498-1502; y J.L. Wang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 7124-7129), la estructura 3D de Bcl-2 en complejo con el péptido BH3 de

Bak fue modelada en base a la estructura experimental de RMN de Bcl-X_L acomplejada con el péptido BH3 de Bak. (S. Michael y col., Science, 275: 983-986). La estructura de complejo 3D modelada fue refinada mediante simulación de dinámica molecular (DM) en agua explícita usando el programa CHARMM (B.R. Brooks y col., J. Comp. Chem., 4: 187-217; y P.V.R. Schleyer y col., CHARMM: The Energy Function and Its Parameterization with an Overview of the Program, en The Encyclopedia of Computational Chemistry, 1: 271-277, eds., John Wiley & Sons, Chichester) con el campo de fuerza CHARMM MSI. La estructura refinada de la Bcl-2 en complejo con el péptido BH3 de Bak se muestra en la Figura 2. La Figura 2 muestra una representación de lazo de la estructura global de la Bcl-2 en complejo con el péptido BH3 de Bak. Los inhibidores potenciales se confirman mediante ensayos bioquímicos y biológicos.

En comparación con el escrutinio aleatorio, la búsqueda en bases de datos 3D basada en la estructura es muy efectiva y económica. Se construyó una base de datos tridimensional que contiene aproximadamente 7.000 compuestos orgánicos pequeños que fueron identificados y aislados a partir de medicinas herbales y se usó en el presente escrutinio de bases de datos basado en la estructura usando el programa DOCK (S. Makino e I.D. Kuntz, J. Comput. Chem. 18: 1812-1825). Los primeros 250 compuestos que presentan la mayor puntuación DOCK fueron considerados como potenciales inhibidores de Bcl-2 y Bcl-X_L. De las moléculas seleccionadas inicialmente, 9 compuestos estaban disponibles comercialmente y fueron obtenidos para continuar con ensayos de unión *in vitro*.

La evaluación adicional de los potenciales inhibidores de molécula pequeña no peptídicos se llevó a cabo usando un ensayo sensible y cuantitativo de unión basado en polarización de fluorescencia (PF) *in vitro* (véase I.J. Enyedy y col., J. Med. Chem., 44: 313-4324). Los 9 compuestos candidatos fueron escrutados usando esta metodología para determinar su capacidad para competir con el péptido BH3 de Bak en la unión a Bcl-2. De los 9 compuestos, se obtuvo que tres compuestos presentaban valores IC₅₀ mejores que 25 µM. Se determinó que el valor IC₅₀ del péptido BH3 de Bak natural es 0,3 µM en los ensayos de unión PF. Cada una de estas tres moléculas pequeñas identificadas demostró bloquear la unión de Bcl-2 y péptido BH3 de Bak. Se observó que el gossipol tiene una afinidad de unión de 10 M con Bcl-2 y que compite con el péptido de Bak.

Puesto que la Bcl-X_L y la Bcl-2 tienen estructuras 3D similares, se razonó que algunos de los inhibidores potenciales de Bcl-2 también se unirían a Bcl-X_L. Por

consiguiente, se dirigieron los esfuerzos de escrutinio a descubrir antagonistas potenciales de molécula pequeña no peptídicos de la Bcl-X_L usando el ensayo de unión basado en PF descrito anteriormente.

Aunque la Bcl-2 y la Bcl-X_L tienen ambas funciones anti-apoptóticas, estas dos proteínas tienen diferentes modelos de expresión en cánceres humanos. Además, aunque la Bcl-2 y la Bcl-X_L comparten sitios de unión de BH3 estructuralmente similares, existen algunas diferencias. Se descubrió que aunque algunos inhibidores de molécula pequeña de la Bcl-2 también tienen una buena afinidad de unión por la Bcl-X_L, otros inhibidores de molécula pequeña sólo se unían débilmente a Bcl-X_L (aunque un ligando débil aún puede tener utilidad como inhibidor). Recíprocamente, algunos inhibidores de molécula pequeña de Bcl-2 relativamente débiles tenían una potencia de unión mucho mayor con la Bcl-X_L. En particular, se descubrió que el gosipol, un inhibidor moderadamente potente de la Bcl-2, mostraba una potente actividad de unión con la Bcl-X_L con un valor de IC₅₀ de 0,4 µM (Figura 3). La Figura 3 muestra la inhibición directa de la unión entre el péptido BH3 de Bak y Bcl-2 (Bcl-X_L) con gosipol, determinada mediante ensayo de unión basado en PF. El péptido de Bak no marcado PF tiene un valor de IC₅₀ de 0,3 µM con la Bcl-X_L. En los presentes ensayos de unión de Bcl-X_L basados en PF, se determinó que el péptido de Bak tiene un valor de IC₅₀ de 0,3 µM de unión a Bcl-X_L. Por tanto, el gosipol es un potente inhibidor para la Bcl-X_L, que tiene una potencia similar a la del péptido de Bak y que también es un inhibidor moderadamente potente de la Bcl-2.

III. Caracterización de la familia Bcl-2 de proteínas en líneas de células cancerosas

Para comprender mejor el mecanismo molecular de inhibidores de molécula pequeña de Bcl-2 y Bcl-XL, se caracterizó la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en varias líneas de células de cáncer de mama, y otras líneas de células cancerosas, procedentes del programa de escrutinio de fármacos anticancerígenos del National Cancer Institute. Los resultados con 5 líneas de células cancerosas representativas (es decir, MDA-MB-231, T-47D, y MDA-435, líneas de células de cáncer de mama, la línea celular de leucemia HL-60, y la línea de células de cáncer de colon HT-29) y con 1 línea de células de fibroblasto normal (WI-38) se muestran en la Figura 4. La línea celular de leucemia HL-60 presentó el nivel más alto de expresión de Bcl-2, mientras que las líneas de células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MDA-MB-435 también mostraron niveles muy elevados de Bcl-2. Las líneas de células de cáncer de mama

MDA-MB-231 y T-47D, así como la línea de células de cáncer de colon HT-29 también mostraron niveles muy altos de expresión de Bcl-X_L. La línea de células de fibroblasto normal mostró un nivel bajo de Bcl-2 y Bcl-X_L.

La familia Bcl-2 de proteínas actúa como árbitro de la muerte celular programada. El equilibrio entre las moléculas anti-apoptóticas (por ejemplo, Bcl-2 y Bcl-X_L) y las moléculas pro-apoptóticas (por ejemplo, Bid, Bax, Bak y Bad) desempeña un papel importante en la apoptosis. Por esta razón, también se determinó el estatus de la expresión de las proteínas pro-apoptóticas Bid, Bax, Bak y Bad en las líneas de células cancerosas MDA-MB-231, T-47D, MDA-435, HL-60 y HT-29, y en la línea de células de fibroblasto normal WI-38 (Figura 4). Todas las líneas celulares evaluadas, incluyendo la línea de células de fibroblasto normal WI-38, expresan niveles elevados de Bax y la mayoría de las líneas celulares de cáncer también expresan niveles elevados de Bak. Existen variaciones significativas en los niveles de expresión de Bid y Bad entre las diferentes líneas celulares. Consideradas en conjunto, las 5 líneas celulares de cáncer evaluadas mostraron niveles elevados de proteínas de la familia Bcl-2 tanto anti-apoptóticas como pro-apoptóticas, mientras que la línea de células de fibroblasto normal (WI-38) mostró niveles bajos de Bcl-2 y Bcl-X_L, pero niveles elevados de las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, Bax y Bad.

También se evaluaron otras varias líneas celulares de cáncer de mama usadas en el National Cancer Institute (NCI) en sus esfuerzos de escrutinio de fármacos anticancerígenos. Estas líneas incluye BT-549, HS 578T, MCF-7 y NCI/ADR-Resistente. De éstas, la MCF-7 y la BT-549 presentan niveles elevados de proteína Bcl-2, mientras que la BT-549 también presenta un nivel elevado de proteína Bcl-X_L. La HS 578T y la NCI/ADR-RES tienen niveles medios de proteína Bcl-X_L. Por tanto, de las 7 líneas de células de cáncer de mama examinadas (es decir, MDA-MB-231, T-47D, MDA-435, BT-549, HS 578T, MCF-7 y NCI/ADR-Resistente), 5 de las líneas celulares tienen niveles elevados de expresión de una, o de ambas, de Bcl-2 y Bcl-X_L. Dos líneas de células de cáncer de mama tienen niveles medios de expresión de Bcl-2 y Bcl-X_L. Ninguna de las 7 líneas celulares de cáncer de mama evaluadas presentó una baja expresión de Bcl-2 y de Bcl-X_L.

IV. El gosipol inhibe el crecimiento y la proliferación de células cancerosas

Los ensayos de polarización de fluorescencia demostraron que el gosipol desplaza la unión de péptido BH3 de Bak con Bcl-2 y con Bcl-X_L. Por tanto, la presente

invención contempla que un inhibidor de molécula pequeña (por ejemplo, gosipol) que se une al dominio de unión BH3 de la Bcl-2 o de la Bcl-X_L bloquea las funciones anti-apoptóticas de dichas moléculas, lo que a su vez induce la apoptosis en células cancerosas con una elevada expresión de Bcl-2 y/o de Bcl-X_L. Se contempla además que los inhibidores de molécula pequeña (por ejemplo, gosipol) también disminuyen la viabilidad y la proliferación en células cancerosas con una elevada expresión de Bcl-2 y/o Bcl-X_L. El gosipol inhibe la proliferación (crecimiento) celular en el cáncer, y más particularmente, en cánceres de mama humanos (por ejemplo, MDA-MB-231). La línea de células de cáncer de mama MDA-MB-231 tiene un elevado nivel de expresión de Bcl-2 y Bcl-X_L. La capacidad del gosipol para inhibir el crecimiento celular de MDA-MB-231 se evaluó en un ensayo MTT de 5 días. Se demostró que el gosipol inhibe el crecimiento de células MDA-MB-231 con un valor de IC₅₀ de 2,0 µM.

Los resultados correspondientes a las células MB-231 y WI-38 tratadas con 20 µM de gosipol durante 24 horas detectados mediante el ensayo de Colorante Hoechst se presentan en las Figuras 5A y 5B, respectivamente. El tratamiento de células cancerosas de MDA-MB-231 con gosipol induce la apoptosis en las células cancerosas, pero no en las células de fibroblasto de WI-38 normales. La Figura 5A muestra la inducción de apoptosis en las células de MDA-231. La Figura 5B muestra que el tratamiento con gosipol no induce la apoptosis en células normales de fibroblasto WI-38 que presentan niveles bajos (por ejemplo, niveles basales) de expresión de Bcl-2 y Bcl-X_L.

En otros ensayos, se demostró que el gosipol induce apoptosis en células de cáncer de mama T-47D que presentan niveles elevados de expresión de Bcl-X_L, pero no niveles bajos de expresión de Bcl-2. También se descubrió que el gosipol induce apoptosis en otras líneas de células cancerosas con una elevada Bcl-X_L, tal como la línea de células de cáncer de colon humano HT-29, pero no en las líneas celulares de cáncer con baja expresión de Bcl-2 y de Bcl-X_L, tal como la línea de células de cáncer de próstata DU-145.

Se llevaron a cabo pruebas adicionales usando un ensayo de citometría de flujo de Anexina-V (FACS) para determinar más cuantitativamente la potencia del gosipol para inducir la apoptosis en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Por ejemplo, la Figura 6 muestra que el gosipol indujo apoptosis en las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 tratadas con gosipol durante 24 horas, detectada usando citometría de flujo de Anexina-V. Se observó que un 5,0 µM de gosipol inducía apoptosis en el 59% de las células. La inducción de la apoptosis por gosipol es

dependiente de la dosis. A concentraciones de gossipol 10 y 20,0 μM el gossipol indujo apoptosis en el 74% y el 96% de las células cancerosas, respectivamente. El MDA-231 sobreexpresa tanto Bcl-2 como Bcl-X_L.

Puesto que el gossipol es un potente inhibidor de Bcl-X_L, la presente invención
5 contempla que el gossipol pueda inducir apoptosis en células cancerosas con niveles elevados de Bcl-X_L pero con nivel bajo de Bcl-2. De hecho, el gossipol induce la apoptosis dependiente de dosis en células de cáncer de mama T-47D, que como se ha mostrado anteriormente, presentan niveles elevados de Bcl-X_L pero niveles bajos de Bcl-2. La Figura 7 muestra la inducción de apoptosis dependiente de dosis en
10 células de cáncer TD-47 humano tratadas con gossipol durante 24 horas, detectada usando citometría de flujo de Anexina-V.

Estas pruebas muestran que el gossipol es un inhibidor potencial de Bcl-X_L y que hace entrar en apoptosis a células cancerosas que expresan niveles elevados de Bcl-X_L (por ejemplo, una sobreexpresión comparada con la tasa de expresión basal
15 para un ejemplo normal del tipo de célula), pero no induce apoptosis en células con niveles normales de expresión de Bcl-2 y Bcl-X_L (por ejemplo, WI-38).

Algunas realizaciones de la presente invención están relacionadas con (-)-gossipol para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece una afección que se caracteriza por la sobreexpresión de proteínas de la familia Bcl-2. Los compuestos de
20 gossipol contemplados para su uso en la presente invención incluyen (-)-gossipol y sales farmacéuticamente aceptables de (-)-gossipol.

En las realizaciones particularmente preferidas, se administra a un paciente el enantiómero (-)-gossipol (que incluye derivados, metabolitos, bases de Schiff y sales farmacéuticamente aceptables del mismo).

25 El análisis de RMN de la unión de los enantiómeros (-)-gossipol y (+)-gossipol concluyó que tanto el enantiómero (-)-gossipol como el enantiómero (+)-gossipol se unen a Bcl-X_L (Figuras 8A y 8B).

La Figura 9 muestra datos de los experimentos de inhibición del crecimiento que comparan los enantiómeros (-)-gossipol y (+)-gossipol y el gossipol racémico en la
30 línea de células de cáncer de mama MDA-MB-231 (2-LMP) (3000/200 μL /pocillo usando el ensayo MTT, 5 días, gossipol racémico IC₅₀ 3,2 μM ; (-)-gossipol IC₅₀ 1,7 μM ; y (+)-gossipol IC₅₀ 10 μM).

Estudios previos demostraron que el T_{1/2} de eliminación del enantiómero (+)-gossipol en humanos es 29 veces superior al del (-)-gossipol. Por lo tanto, el
35 enantiómero (+)-gossipol es potencialmente más tóxico que el enantiómero (-)-gossipol.

Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención contempla que la administración del enantiómero (-)-gosipol es potencialmente menos tóxica que la forma racémica del gosipol o que el enantiómero (+)-gosipol.

En otras realizaciones, se administra (-)-gosipol (super-G) a pacientes con
 5 cáncer de cabeza-cuello que se caracteriza por la sobreexpresión de una proteína de la familia Bcl-2. La Tabla 1, presentada a continuación, compara la inhibición del crecimiento celular en una serie de líneas celulares de cáncer de cabeza-cuello por (-)-gosipol y cisplatino (un agente estándar para el tratamiento del cáncer de cabeza-cuello). La Tabla 1 muestra que el (-)-gosipol inhibe potentemente el crecimiento de
 10 células cancerosas en las líneas celulares de cáncer de cabeza-cuello humano con nivel elevado de proteína Bcl-X_L. Estas líneas celulares de cáncer son muy resistentes al cisplatino, un agente de quimioterapia habitual para el tratamiento del cáncer de cabeza-cuello.

15 **Tabla 1**

	Super-G (IC ₅₀ , μM)	Bcl-X _L	Bcl-2	IC ₅₀ de cisplatino (μM)
UM-SCC-23	1,5	+++	-	25
UM-SCC-1	1,5	+++	-	30
UM-SCC-25	8	+	-	43

La Figura 10 proporciona las estructuras químicas del gosipol, la gosipolona y las bases de Schiff del gosipol y la gosipolona.

20

V. Mecanismo propuesto para la actividad del gosipol

Aunque no es necesario comprender el mecanismo para llevar a la práctica la presente invención, y la presente invención no está limitada por ello, se contempla que una de las moléculas clave en el mecanismo de apoptosis mediado por Bcl-2/Bcl-X_L es el citocromo-c (Cit-c). Por consiguiente, se contempla adicionalmente que una de las
 25 funciones clave de Bcl-2/Bcl-X_L es la de heterodimerizarse con Bax, Bak o Bad y bloquear la liberación de Cit-c desde las mitocondrias. Por tanto, se evaluó la capacidad del gosipol para inducir la liberación de Cit-c desde las mitocondrias al citosol en células cancerosas. Se trataron líneas celulares de cáncer de mama MDA-
 30 231 y T47D con 5 ó 20 μM de gosipol durante 24 horas. La Figura 11 muestra que se

liberó Cit-c desde las mitocondrias al citosol después del tratamiento con 20 μ M de gosipol en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-231 y T47D (HM, Cit-c encontrado en la membrana pesada (“heavy membrane” en inglés); Citosol, Cit-c encontrado en el citosol).

5 Aunque sin estar limitado a ningún mecanismo concreto, también se contempla que la apoptosis mediada por Bcl-2 implica la activación de caspasa (por ejemplo, caspasa-3 y -9) una vez que el Cit-c es liberado de las mitocondrias. Por tanto, se realizaron pruebas para determinar si el gosipol activa caspasa-3. Se midió la cantidad de liberación de caspasa-3 en lisatos de células de cáncer de mama MDA-231
10 después de 12 ó 24 horas de tratamiento con gosipol. La Figura 12 muestra que la caspasa-3 fue liberada después del tratamiento con gosipol en fragmentos de 17 y 21 k_D de un modo dependiente de la dosis. Se obtuvieron resultados similares con las células de cáncer de mama humano T-47D y con las células de cáncer de colon HT-29 tratadas con gosipol, ambas con niveles elevados de expresión de Bcl-X_L y niveles
15 relativamente bajos de expresión de Bcl-2. Por el contrario, el tratamiento de células de cáncer de próstata humano DU-145, que tiene una baja expresión de Bcl-2 y de Bcl-X_L, con 5, 10 ó 20 μ M de gosipol durante 24 horas no tuvo efecto sobre la activación de caspasa-3. Por lo tanto, la activación de caspasa-3 por gosipol es específica y se correlaciona con los niveles de expresión de Bcl-X_L en células
20 cancerosas.

VI. Actividad del gosipol en ratones de xenoinjerto MDA-231 solo y en combinación con agentes anticancerígenos convencionales

Se evaluó adicionalmente el potencial del compuesto de gosipol como agente
25 terapéutico anticancerígeno en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (subclon 2LMP) en ratones nude. Se comenzó un régimen de tratamiento con gosipol el día 7 cuando los tumores de los ratones habían crecido hasta un diámetro de 8-10 mm. Cada grupo de tratamiento tenía 5 ratones que portaban 10 tumores humanos (un tumor en cada lado). El grupo de control tenía 5
30 ratones a los que no se administró gosipol. En los ratones tratados, se administró gosipol diariamente en dos dosis orales diferentes, una dosis de 30 mg/kg y una dosis de 90 mg/kg, durante tres semanas. Se descubrió que con ambas dosis, 30 y 90 mg/kg diarios, se produce una inhibición de más del 70% del crecimiento tumoral por efecto del gosipol con un nivel de confianza del 95% en el día 29. No se observaron
35 pérdidas de peso o muertes en los ratones tratados con gosipol. No apareció ninguna

diferencia significativa en la actividad anticancerígena del gosipol en las dosis de 30 mg/kg y 90 mg/kg. Estos resultados sugieren que una dosis diaria de 30 mg/kg de gosipol inhibe con éxito el crecimiento tumoral sin complementar la terapia de gosipol con adyuvantes o compuestos o terapias anticancerígenas adicionales.

- 5 La sobreexpresión de Bcl-X_L parece proteger a las células cancerosas frente a la apoptosis inducida por algunas terapias anticancerígenas convencionales (por ejemplo, docetaxel). Algunas realizaciones de la presente invención, por tanto, proporcionan la administración de una(s) dosis efectiva(s) de gosipol (y enantiómeros, derivados y sales farmacéuticamente aceptables del mismo) en combinación con al
- 10 menos una terapia anticancerígena convencional (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos tales como docetaxel, y/o terapia con radiación).

- En las realizaciones preferidas, se administra (-)-gosipol en combinación en combinación con una o más terapias anticancerígenas convencionales para tratar enfermedades (por ejemplo, cáncer) caracterizadas por la sobreexpresión de proteínas
- 15 de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2 y/o Bcl-X_L).

- Aunque no es necesario comprender el mecanismo para llevar a la práctica la presente invención, y la presente invención no está limitada por ello, se contempla que la administración de (-)-gosipol en combinación con una terapia anticancerígena convencional (por ejemplo, productos quimioterapéuticos tales como el docetaxel) se
- 20 contempla que hace sensibles al tratamiento con gosipol y/o agentes anticancerígenos adicionales (por ejemplo, docetaxel) a las células cancerosas con niveles elevados de expresión de proteínas de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2 y/o Bcl-X_L) que son resistentes a las terapias anticancerígenas convencionales. Sin embargo, la presente invención no se limita a la administración de ninguna combinación particular de
- 25 compuestos de gosipol y agentes terapéuticos anticancerígenos, ni la invención se limita a ninguna secuencia o nivel particulares de agentes a administrar.

- Puesto que el gosipol logra una inhibición significativa del crecimiento tumoral con una dosis diaria de aproximadamente 30 mg/kg, se seleccionó dicho nivel de dosis para evaluar combinaciones de gosipol con otras agentes terapéuticos
- 30 convencionales. Un grupo de 10 ratones recibieron una dosis diaria de 30 mg/kg de gosipol administrados oralmente comenzando en el día 7 y durante 4 semanas. También en el séptimo día, los mismos 10 ratones fueron administrados con una dosis i.p. semanal (7,5 mg/kg) de docetaxel durante 3 semanas. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 13. En particular, la Figura 13 muestra la
- 35 inhibición del crecimiento tumoral por gosipol o docetaxel solos o en combinación en

ratones nude con xenoinjerto de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Cada grupo experimental constaba de 10 animales. La Figura 13 muestra que la administración de gosipol solo (30 mg/kg diarios), o de docetaxel solo en una dosis por debajo de la óptima (7,5 mg/kg semanalmente), inhibió significativamente el crecimiento tumoral en los animales del ensayo, sin embargo, los animales evaluados que recibieron una terapia de combinación de gosipol y docetaxel mostraron una inhibición incluso mayor del crecimiento tumoral. Cabe destacar que en el grupo, 3 de cada 10 ratones (6 tumores) tratados con una combinación de gosipol y docetaxel mostraron una regresión completa del tumor. En global se produjo una inhibición del 90% del crecimiento tumoral en el grupo de terapia de combinación en comparación con el grupo de control. Se llevaron a cabo análisis estadísticos usando el programa SAS (véase G. Verbeke y G. Molenberghs, Linear mixed models in practice: An SAS-orientated approach, Springer-Verlag, volumen 126). Los resultados se muestran en la Tabla 2 presentada a continuación.

Tabla 2

	Control	Gosipol	Docetaxel
Gosipol	0,008 [*]		
	(0,06 [‡])		
Docetaxel	0,003		
	(0,01)		
Gosipol +	0,00001	0,005	0,01
Docetaxel	(0,0000004)	(0,009)	(0,002)
* día 41			
‡ día 47			

Los resultados indican que la actividad anticancerígena del gosipol y el docetaxel es estadísticamente significativa comparada con los controles en los días 41 y 47 del estudio. Además, la actividad anticancerígena de la combinación de gosipol y docetaxel es significativa en comparación con los grupos de control (no tratados), y con los grupos tratados con gosipol o con docetaxel por separado. Considerados en conjunto, estos datos indican que el gosipol tiene una actividad anticancerígena significativa por sí solo, pero que en algunas realizaciones alcanza una actividad

incluso superior cuando se administra en combinación con un agente anticancerígeno convencional (por ejemplo, un agente quimioterapéutico tal como el docetaxel).

Aunque no es necesario comprender el mecanismo para llevar a la práctica la presente invención, y la presente invención no está limitada por ello, se contempla que los efectos sinérgicos observados en algunas combinaciones de agentes anticancerígenos convencionales y compuestos de gossypol se debe a diferentes mecanismos de acción de los dos compuestos (por ejemplo, inhibición de la actividad de Bcl-X_L por el gossypol y el ataque a microtúbulos por el docetaxel).

En otras realizaciones, nuevamente, aunque no es necesario comprender el mecanismo para llevar a la práctica la presente invención, y la presente invención no está limitada por ello, se contempla que los efectos sinérgicos observados en algunas combinaciones de agentes anticancerígenos convencionales y compuestos de gossypol se debe a mecanismos similares de acción de los dos componentes (por ejemplo, inhibición de la actividad de Bcl-X_L por gossypol y uno o más agentes anticancerígenos adicionales).

Por ejemplo, en una realización el enantiómero (-)-gossypol administrado conjuntamente con el agente terapéutico anticancerígeno convencional taxol proporciona un beneficio sinérgico. La Figura 14 muestra los efectos sinérgicos de la administración conjunta del enantiómero de (-)-gossypol y taxol. En resumen, este experimento usó una relación 100:1 de enantiómeros (-)-gossypol y (+)-gossypol a taxol en una línea celular de cáncer de mama MCF-7 ((-)-gossypol IC₅₀ 8,71 μM; (+)-gossypol IC₅₀ 22,88 μM; taxol + (-)-gossypol IC₅₀ 2,755 μM; y taxol + (+)-gossypol IC₅₀ 10,57 μM).

De forma similar, las Figuras 15A y 15B proporcionan un índice de combinación que indica que existe una sinergia muy fuerte entre el (-)-gossypol y el taxol, así como entre el (+)-gossypol y el taxol.

La Figura 16 muestra la unión de gossypolona a Bcl-X_L. La Figura 17 muestra la unión de la base de Schiff de etilo de (-)-gossypol.

VII. Agentes terapéuticos combinados o administrados conjuntamente con gossypol

Un amplio abanico de agentes terapéuticos presenta utilidad con la presente invención. Cualquier agente terapéutico que pueda ser administrado conjuntamente con los compuestos de gossypol, o asociado a compuestos de gossypol, es adecuado para su uso en la presente invención.

Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de (-)-gospol (y sus enantiómeros, derivados y sales farmacéuticamente aceptables) y al menos un agente anticancerígeno (por ejemplo, un agente anticancerígeno convencional tal como fármacos quimioterapéuticos y/o radioterapia). En algunas de estas realizaciones, el sujeto 5 padece una enfermedad que se caracteriza por la sobreexpresión intercelular de proteínas de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2 y/o Bcl-X_L).

Los mecanismos de agentes anticancerígenos adecuados para su uso con la presente invención incluyen agentes que inducen apoptosis, agentes que 10 inducen/provocan daños en ácidos nucleicos, agentes que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos, agentes que afectan a la formación de microtúbulos y agentes que afectan a la síntesis o la estabilidad de proteínas.

Las clases de agentes anticancerígenos adecuados para su uso en las composiciones y métodos de la presente invención incluyen: 1) alcaloides, que 15 incluyen inhibidores de microtúbulos (por ejemplo, Vincristina, Vinblastina y Vindesina, etc.), estabilizadores de microtúbulos (por ejemplo, Paclitaxel [Taxol] y Docetaxel, etc.), e inhibidores de la función de cromatina, que incluyen inhibidores de topoisomerasa tales como las epipodofilotoxinas (por ejemplo, Etoposide [VP-16], y Teniposide [VM-26], etc.), y agentes que atacan topoisomerasa I (por ejemplo, 20 Camptotecina e Irinotecan [CPT-11], etc.); 2) agentes de unión covalente a ADN [agentes alquilantes], que incluyen mostazas de nitrógeno (por ejemplo, Mecloretamina, Clorambucilo, Ciclofosfamida, Ifosfamida y Busulfan [Mileran], etc.), nitrosoureas (por ejemplo, Carmustina, Lomustina y Semustina, etc.), y otros agentes alquilantes (por ejemplo, Dacarbazina, Hidroximetilmelamina, Tiotepa y Mitocicina, 25 etc.); 3) agentes de unión no covalente a ADN [antibióticos antitumorales], que incluyen inhibidores de ácido nucleico (por ejemplo, Dactinomicina [Actinomicina D], etc.), antraciclinas (por ejemplo, Daunorubicina [Daunomicin y Cerubidina], Doxorubicina [Adriamicina] e Idarubicina [Idamicina], etc.), antracenodionas (por ejemplo, análogos de antraciclina tales como [Mitoxantrona], etc.), bleomicinas 30 (Blenoxane), etc., y plicamicina (Mitramicina), etc.; 4) antimetabolitos, que incluyen antifolatos (por ejemplo, Metotrexato, Folex y Mexato, etc.), antimetabolitos de purina (por ejemplo, 6-Mercaptopurina [6-MP, Purinetol], 6-Tioguanina [6-TG], Azatioprina, Aciclovir, Ganciclovir, Clorodesoxiadenosina, 2-Clorodesoxiadenosina [CdA], y 2'-Desoxicoformicina [Pentostatina], etc.), antagonistas de pirimidina (por ejemplo, 35 fluoropirimidinas [por ejemplo, 5-fluorouracilo (Afluridil), 5-fluorodesoxiuridina (FdUrd)

(Floxuridina)] etc.), y arabinósidos de citosina (por ejemplo, Citosar [ara-C] y Fludarabina, etc.); 5) enzimas, que incluyen L-asparaginasa e hidroxurea, etc.; 6) hormonas, que incluyen glucocorticoides, tales como antiestrógenos (por ejemplo, Tamoxifeno, etc.), antiandrógenos no esteroideos (por ejemplo, Flutamida, etc.), e inhibidores de aromatasa (por ejemplo, anastrozol [Arimidex], etc.); 7) compuestos de platino (por ejemplo, Cisplatino y Carboplatino, etc.); 8) anticuerpos monoclonales conjugados con fármacos anticancerígenos, toxinas y/o radionucleidos, etc.; 9) modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo, interferones [por ejemplo, IFN- α , etc.] e interleuquinas [por ejemplo, IL-2, etc.], etc.); 10) inmunoterapia adoptiva; 11) factores de crecimiento hematopoyéticos; 12) agentes que inducen diferenciación de células tumorales (por ejemplo, ácido todo-trans-retinoico, etc.); 13) técnicas de terapia génica; 14) técnicas de terapia antisentido; 15) vacunas tumorales; 16) terapias dirigidas contra la metástasis tumoral (por ejemplo, Batimistat, etc.); y 17) inhibidores de la angiogénesis.

En las realizaciones preferidas, la presente invención proporciona la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de (-)-gospol y al menos un agente anticancerígeno convencional que induce apoptosis. En algunas realizaciones preferidas, el sujeto tiene una enfermedad que se caracteriza por la sobreexpresión de proteína(s) de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2 y/o Bcl-X_L). En otras realizaciones preferidas, la presente invención proporciona la administración de una cantidad efectiva de gospol y un taxano (por ejemplo, Docetaxel) a un sujeto que padece una enfermedad que se caracteriza por la sobreexpresión de proteína(s) de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2 y/o Bcl-X_L).

Los taxanos (por ejemplo, Docetaxel) son una clase efectiva de agentes quimioterapéuticos anticancerígenos. (Véase, por ejemplo, K.D. Miller y G.W. Sledge, Jr. Cancer Investigation, 17: 121-136). Aunque la presente invención no pretende estar limitada por ningún mecanismo particular, se cree que la muerte celular mediada por taxano se produce a través de la estabilización de los microtúbulos intercelulares y la consiguiente inducción del mecanismo apoptótico (véase, por ejemplo, S. Haldar y col, Cancer Research, 57: 229-233). En muchos sistemas, la Bcl-2 y la Bcl-X_L actúan como control negativo de este mecanismo.

En algunas realizaciones adicionales, se contemplan específicamente el cisplatino y el taxol para su uso con los compuestos de gospol. El cisplatino y el taxol tienen una función bien definida de inducción de apoptosis en células tumorales (véase, por ejemplo, Lanni y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 94: 9679; Tortora y col.,

Cancer Research 57: 5107; y Zaffaroni y col., Brit. J. Cancer 77: 1378). Sin embargo, el tratamiento con estos y otros agentes quimioterapéuticos es difícil de llevar a cabo sin incurrir en una toxicidad significativa. Los agentes que se usan en la actualidad generalmente son poco solubles en agua, bastante tóxicos y se administran en dosis que afectan tanto a las células normales como a las células enfermas. Por ejemplo, el paclitaxel (Taxol), uno de los compuestos anticancerígenos más prometedores descubiertos, es poco soluble en agua. El Paclitaxel ha demostrado una excelente actividad antitumoral en una amplia variedad de modelos de tumor tales como el melanoma B16, las leucemias L1210, los tumores mamarios MX-1 y los xenoinjertos de tumor de colon CS-1. Sin embargo, la escasa solubilidad en agua del paclitaxel representa un problema para la administración a humanos. Por consiguiente, las formulaciones actuales de paclitaxel requieren un cremáforo para solubilizar el fármaco. El intervalo de dosis clínica en humanos es 200-500 mg. Esta dosis se disuelve en una disolución 1:1 de etanol:cremáforo y se diluye hasta un litro de fluido administrado intravenosamente. Actualmente el cremáforo usado es aceite de ricino polietoxilado. Se administra mediante infusión por disolución en la mezcla de cremáforo y dilución con grandes volúmenes de un vehículo acuoso. La administración directa (por ejemplo, subcutánea) produce como resultado toxicidad local y niveles bajos de actividad.

La presente invención también proporciona la oportunidad para monitorizar el éxito terapéutico tras la administración de cisplatino y/o Taxol a un sujeto. Por ejemplo, se muestra que la medida de la capacidad de estos fármacos para inducir apoptosis *in vitro* es un generador de eficacia *in vivo* (Gibb, Gynecologic Oncology, 65: 13). Por tanto, además de la administración dirigida de uno de estos fármacos, o de ambos, para proporcionar una terapia antitumoral efectiva y reducir la toxicidad, la eficacia del agente terapéutico puede medirse mediante técnicas de la presente invención que monitorizan la inducción de apoptosis. Cabe destacar que ambos agentes terapéuticos son activos contra un amplio abanico de tipos de tumores que incluyen, aunque sin limitación, cáncer de mama y cáncer de colon (Akutsu y col., Eur. J. Cancer 31A: 2341).

Cualquier producto farmacéutico que se use rutinariamente en un contexto de terapia contra el cáncer tiene utilidad en la presente invención. Los agentes anticancerígenos convencionales que son adecuados para la administración con los compuestos de gosispol descritos incluyen, aunque sin limitación, adriamicina, 5-fluorouracilo, etoposide, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina-C, o más

preferiblemente cisplatino. Estos agentes pueden prepararse y usarse como una composición terapéutica combinada, o un kit, mediante su combinación con un agente inmunoterapéutico, tal como se describe en la presente memoria.

5 En las realizaciones relacionadas de la presente invención, el uso terapéutico de (-)-gospol comprende además uno o más agentes que reticulan directamente ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN) para facilitar el daño a ADN que conduce a agentes sinérgicos, antineoplásticos, de la presente invención. Se pueden usar agentes tales como el cisplatino y otros agentes alquilantes de ADN. El cisplatino ha sido usado ampliamente para tratar el cáncer, usándose dosis eficaces en 10 aplicaciones clínicas de 20 mg/M² durante 5 días cada tres semanas por un total de tres ciclos. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier método adecuado, que incluye, aunque sin limitación, inyección intravenosa, subcutánea, intratumoral, intraperitoneal o tópica (por ejemplo, en superficies mucosas).

15 Los agentes que dañan el ADN también pueden incluir compuestos que interfieren en la replicación del ADN, la mitosis y la segregación cromosomal. Dichos compuestos quimioterapéuticos incluyen, aunque sin limitación, adriamicina, también conocida como doxorubicina, etoposide, verapamil, podofilotoxina, y otros similares. Estos compuestos son ampliamente usados en preparaciones clínicas para el 20 tratamiento de neoplasmas, y se administran a través de inyecciones de bolos intravenosamente en dosis que oscilan entre 25 y 75 mg/M² en intervalos de 21 días para adriamicina, entre 35 y 50 mg/M² para etoposide intravenosamente o el doble de la dosis intravenosa oralmente.

Los agentes que afectan a la síntesis y a la fidelidad de los precursores y 25 subunidades de ácido nucleico también conducen a un daño en el ADN, y tienen uso como agentes quimioterapéuticos en la presente invención. Se han desarrollado una serie de precursores de ácido nucleico. Particularmente útiles son los agentes que han sido sometidos a una evaluación exhaustiva y que se encuentran disponibles fácilmente. Como tales, agentes como el 5-fluorouracilo (5-FU) se usan preferentemente 30 mediante tejido neoplástico, haciendo que este agente sea particularmente útil para atacar células neoplásticas. Las dosis administradas pueden oscilar entre 3 y 15 mg/kg·día, aunque otras dosis pueden variar considerablemente según varios factores que incluyen el estadio de la enfermedad, la facilidad de las células para admitir la terapia, la cantidad de resistencia a los agentes, y otros similares.

En las realizaciones preferidas, los agentes anticancerígenos usados en la presente invención son aquellos que son susceptibles de administración conjunta con los compuestos de gosipol descritos, o que están asociados a los compuestos de gosipol descritos de tal modo que pueden ser administrados a un sujeto, tejido o célula sin perder la fidelidad del efecto anticancerígeno. Para una descripción más detallada de agentes terapéuticos contra el cáncer tales como un complejo de platino, verapamil, podofilotoxina, carboplatino, procarbacin, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalan, clorambucilo, bisulfano, nitrosurea, adriamicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etoposide (VP16), tamoxifeno, taxol, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato y otros agentes anticancerígenos similares, los especialistas en la técnica pueden consultar cualquiera de una serie de manuales instructivos que incluyen, aunque sin limitación, la referencia Physician's Desk y el "Pharmaceutical Basis of Therapeutics" de Goodman y Gilman, novena edición, Eds. Hardman y col., 1996.

En realizaciones relacionadas, los fármacos se unen a los compuestos de gosipol con ligandos fotoeliminables. Por ejemplo, Ottl y col. Describen varios ligandos heterobifuncionales fotoeliminables que tienen utilidad en la presente invención (Ottl y col., Bioconjugate Chem., 9: 143). Estos ligandos pueden ser solubles en agua o en medio orgánico. Contienen un éster activado que puede reaccionar con aminas o alcoholes y un epóxido que puede reaccionar con un grupo tiol. Entre los dos grupos hay un grupo de fotoisomerización 3,4-dimetoxi-6-nitrofenilo, que cuando es expuesto a luz ultravioleta cercana (365 nm), libera la amina o el alcohol de forma intacta. De este modo, el agente terapéutico, cuando está ligado a las composiciones de la presente invención usando estos ligandos, puede ser liberado en forma biológicamente activa o activable mediante la exposición del área de interés a luz ultravioleta cercana.

En un ejemplo de realización, el grupo alcohol del taxol se hace reaccionar con el éster activado del ligando soluble en medio orgánico. Este producto se hace reaccionar a su vez con la superficie parcialmente tiolada de dendrímeros apropiados (las aminas primarias de los dendrímeros pueden ser convertidas parcialmente en grupos que contienen tiol por reacción con una cantidad por debajo de la estequiométrica de 2-iminotiolano). En el caso del cisplatino, los grupos amino del fármaco se hacen reaccionar con la forma soluble en agua del ligando. Si los grupos amino no son suficientemente reactivos se puede usar un análogo activo del cisplatino

que contenga aminas primarias, tal como dicloruro de Pt(II) sulfadiazina (Pasani y col., Inorg. Chim. Acta 80: 99 y Abel y col., Eur. J. Cancer 9: 4). Conjugado de esta forma, el fármaco es inactivo y no dañará a las células normales. Cuando el conjugado se localiza dentro de las células tumorales, es expuesto a luz láser de la longitud de onda de UV cercano apropiada, haciendo que el fármaco activo sea liberado en la célula.

De forma similar, en realizaciones relacionadas de la presente invención, los grupos amino del cisplatino (o de un análogo del mismo) son ligados con un grupo protector fotoeliminable muy hidrofóbico, tal como el grupo 2-nitrobenciloxicarbonilo (Pillai, V.N.R. Synthesis: 1-26). Cuando se expone a luz UV cercana (aproximadamente 365 nm), el grupo hidrofóbico se suelta, dejando intacto al fármaco. Puesto que el propio fármaco es hidrofílico, se difunde hacia el exterior del dendrímero y hacia el interior de la célula tumoral, donde inicia la apoptosis.

Una alternativa a los ligandos fotoeliminables son los ligandos de enzima eliminable. Se ha demostrado que una serie de ligandos fotoeliminables son eficaces como conjugados antitumorales y pueden prepararse combinando productos terapéuticos contra el cáncer, tales como doxorrubicina, con polímeros solubles en agua que tengan ligandos peptídicos cortos apropiados (véase, por ejemplo, Vasey y col., Clin. Cancer Res., 5: 83). Los ligandos son estables fuera de la célula, pero son eliminados mediante tiolproteasas una vez que están dentro de la célula. En una realización preferida se usa el conjugado PK1. Como alternativa a la estrategia de ligando fotoeliminable, se pueden usar ligandos de enzima degradable, tal como Gly-Phe-Leu-Gly.

Por ejemplo, otros conjugados que tienen utilidad con la presente invención incluyen, aunque sin limitación, el uso de grupos de boro para BNCT (Capala y col., Bioconjugate Chem., 7: 7), el uso de radioisótopos y la conjugación de toxinas tales como la ricina.

También se pueden usar agentes terapéuticos antimicrobianos como agentes terapéuticos en la presente invención. Se puede usar cualquier agente que pueda matar, inhibir o al menos atenuar la función de organismos microbianos, así como cualquier agente que tenga dichas actividades. Los agentes antimicrobianos incluyen, aunque sin limitación, antibióticos naturales y sintéticos, anticuerpos, proteínas inhibidoras, ácidos nucleicos antisentido, agentes que ataquen la membrana, y otros similares, usados solos o en combinación. De hecho, se puede usar cualquier tipo de antibiótico, que incluye, aunque sin limitación, agentes antibacterianos, agentes antivíricos, agentes antifúngicos, y similares.

En otras realizaciones adicionales, otro componente de la presente invención es que los compuestos de gosisol estén asociados con agentes dirigidos (complejo compuesto de gosisol-agente dirigido) que sean capaces de atacar específicamente un tipo celular concreto (por ejemplo, células tumorales). Generalmente, el compuesto de gosisol que está asociado a un agente dirigido, ataca células neoplásticas mediante la interacción del agente dirigido con un resto superficial de la célula y es introducido en la célula por endocitosis mediada por receptor.

Cualquier resto que se encuentre localizado sobre la superficie de las células atacadas (por ejemplo, células tumorales) tiene utilidad en la presente invención. Por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra dicho resto hace que las composiciones de la presente invención ataquen a las superficies celulares que contengan dicho resto funcional. Alternativamente, el resto "atacante" puede ser un ligando dirigido a un receptor presente sobre la superficie celular o viceversa. De forma similar, también se pueden usar vitaminas para dirigir los agentes terapéuticos de la presente invención a una célula particular.

En realizaciones relacionadas de la presente invención, el resto atacante también puede actuar como un agente para identificar un tumor concreto caracterizado por la expresión de un receptor al que se una el agente atacante (ligando) con, por ejemplo, antígenos específicos de tumores que incluyen, aunque sin limitación, antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, tirosinasa, ras, un antígeno de sialilo de Lewis, erb, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, MN, gp100, gp75, p97, proteinasa 3, una mucina, CD81, CID9, CD63; CD53, CD38, CO-029, CA125, GD2, GM2 y O-acetilo GD3, M-TAA, M-fetal o M-urinario, encuentran utilidad en la presente invención. Alternativamente el resto atacante puede ser un supresor tumoral, una citoquina, una quimioquina, un ligando de receptor específico de tumor, un receptor, un inductor de apoptosis o una agente de diferenciación.

Las proteínas supresoras de tumores contempladas como agente dirigido incluyen, aunque sin limitación, p16, p21, p27, p53, p73, Rb, tumor de Wilms (WT-1), DCC, neurofibromatosis tipo 1 (NF-1), supresor de enfermedad tumoral de von Hippel-Lindau (VHL), Maspina, Brush-1, BRCA-1, BRCA-2, el supresor de tumores múltiples (MTS), antígeno gp95/p97 de melanoma humano, antígeno G250 asociado a carcinoma de célula renal, antígeno de pan-carcinoma KS 1/4, antígeno de carcinoma de ovario (CA125), antígeno específico de próstata, antígeno de melanoma gp75, CD9, CD63, CD53, CD37, R2, CD81, CO029, TI-1, L6 y SAS. Por supuesto son simplemente ejemplos de supresores tumorales y se pretende que la presente

invención pueda usarse en conjunción con cualquier otro agente que el especialista en la técnica identifique, o pueda identificar, como supresor tumoral.

En las realizaciones preferidas de la presente invención, el ataque está dirigido a factores expresados por un oncogén (por ejemplo, *bcl-2* y/o *bcl-X_L*). Estos incluyen, aunque sin limitación, tirosina quinasas, las formas asociadas a membrana y las citoplásmicas, tales como miembros de la familia Src, serina/treonina quinasas, tales como Mos, factor de crecimiento y receptores, tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDDG), SMALL GTPasas (proteínas G) que incluyen la familia *ras*, proteína quinasas dependientes de ciclina (cdk), miembros de la familia *myc* que incluyen *c-myc*, *n-myc* y *L-myc*, y *bcl-2* y miembros de su familia.

Los receptores y sus ligandos relacionados que encuentran utilidad en el contexto de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, el receptor de folato, el receptor adrenérgico, el receptor de hormona de crecimiento, el receptor de hormona luteinizante, el receptor de estrógeno, el receptor de factor de crecimiento epidermal, el receptor de factor de crecimiento de fibroblasto, y otros similares.

Las hormonas y sus receptores que encuentran utilidad en el aspecto de ataque de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, hormona del crecimiento, prolactina, lactógeno placentar, hormona luteinizante, hormona estimuladora de folículo, gonadotropina coriónica, hormona estimulante de tiroide, leptina, adrenocorticotropina (ACTH), angiotensina I, angiotensina II, α -endorfina, hormona de estimulación de melanocito α (α -MSH), colecistoquinina, endotelina I, galanina, péptido inhibidor gástrico (GIP), glucagón, insulina, amilina, lipotropinas, neurofisinas GLP-1 (7-37), y somatostatina.

Adicionalmente, la presente invención contempla que las vitaminas (tanto liposolubles como no liposolubles) usadas como agentes dirigidos pueden usar para atacar células que tienen receptores de dichas vitaminas, o que las captan. Particularmente preferidas para este aspecto de la invención son las vitaminas liposolubles, tales como la vitamina D y sus análogos, la vitamina E, la vitamina A, y similares, o las vitaminas hidrosolubles tales como la vitamina C, y similares.

En algunas realizaciones de la presente invención, un número cualquiera de grupos dirigidos contra células cancerosas se asocia a (-)-gospol. De este modo, el (-)-gospol asociado a grupos dirigidos es específico para atacar células cancerosas (es decir, tiene una probabilidad mucho mayor de unirse a células cancerosas antes que a células sanas).

En las realizaciones preferidas de la presente invención, los grupos dirigidos están asociados (por ejemplo, mediante enlace covalente o no covalente) a (-)-gospol mediante ligandos cortos (por ejemplo, acoplamiento directo), medios (por ejemplo, usando ligandos bifuncionales de molécula pequeña tales como SPDP, vendido por
5 Pierce Chemical Company) o largos (por ejemplo, ligandos bifuncionales de PEG, vendidos por Shearwater Polymers).

En algunas realizaciones, el (-)-gospol se asocia a dendrímeros (por ejemplo, PANAM) o a liposomas y otros vehículos. Los especialistas en la técnica serán capaces de diseñar fácilmente moléculas de compuesto de gospol dendrímero que
10 aprovechan la estructura multivalente de los dendrímeros.

En las realizaciones preferidas de la presente invención, el agente dirigido es un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, unidades Fab). Por ejemplo, un antígeno muy estudiado que se encuentra en la superficie de muchos cánceres (que incluyen tumores HER2 de mama) es la
15 glicoproteína p185, que se expresa exclusivamente en células malignas (Press y col., Oncogene 5: 953). Incluso se ha mostrado que los anticuerpos monoclonales anti-HER2 humanizados recombinantes (rhuMabHER2) inhiben el crecimiento de células de cáncer de mama que sobreexpresan HER2, y están siendo evaluados (en conjunción con agentes quimioterapéuticos convencionales) en ensayos clínicos de
20 fase III para el tratamiento del cáncer de mama avanzado (Pegarn y col., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 14: 106). Park y col. han unido fragmentos Fab de rhuMabHER2 a liposomas unilamelares pequeños, que pueden ser cargados a continuación con el agente quimioterapéutico doxorubicina (dox) y dirigidos contra xenoinjertos de tumor que sobreexpresa HER2 (Park y col., Cancer Lett., 118: 153 y Kirpotin y col.,
25 Biochem., 36: 66). Estos “inmunoliposomas” cargados con dox mostraron un aumento de citotoxicidad contra tumores respecto a los correspondientes liposomas cargados con dox no dirigidos o no cargados con dox, y un descenso de la toxicidad sistémica respecto a los no cargados con dox.

Se pueden generar anticuerpos que permitan atacar a antígenos o
30 inmunogenes (por ejemplo, antígenos específicos de tumor, tejido o patógeno) sobre varias dianas biológicas (por ejemplo, patógenos, células tumorales, tejido normal). Dichos anticuerpos incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, fragmentos Fab y una biblioteca de expresión de Fab.

En algunas realizaciones preferidas, los anticuerpos reconocen epítomos específicos de tumor (por ejemplo, TAG-72) (Kjeldsen y col., Cancer Res. 48: 2214-2220; Patentes de EE.UU. Nº 5.892.010; 5.892.019 y 5.512.443); antígeno de carcinoma humano (Patentes de EE.UU. Nº 5.693.763; 5.545.530 y 5.808.005); antígenos TP1 y TP3 procedentes de células de osteocarcinoma (Patentes de EE.UU. Nº 5.855.866); antígeno de Thomsen-Friedenreich (TF) procedente de células de adenocarcinoma (Patentes de EE.UU. Nº 4.708.930 y 4.743.543); un antígeno de cáncer colorrectal humano (Patente de EE.UU. Nº 4.921.789); antígeno CA125 de cistadenocarcinoma (Patente de EE.UU. Nº 4.921.790); antígeno DF3 de carcinoma de mama humano (Patente de EE.UU. Nº 4.963.484 y 5.053.489); un antígeno de tumor de mama humano (Patente de EE.UU. Nº 4.939.240); antígeno p97 de melanoma humano (Patente de EE.UU. Nº 4.918.164); antígeno de carcinoma o relacionado con orosomucoide (CORA) (Patente de EE.UU. Nº 4.914.021); un antígeno de carcinoma pulmonar humano que reacciona con carcinoma de pulmón de célula escamosa humano pero no con carcinoma de pulmón de célula pequeña humano (Patente de EE.UU. Nº 4.892.935); haptenos T y Tn en glicoproteínas de carcinoma de mama humano (Springer y col., Carbohydr. Res. 178: 271-292), glicoproteína de carcinoma de mama MSA (Tjandra y col., Br. J. Surg. 75: 811-817); antígeno de carcinoma de mama MFGM (Ishida y col., Tumor Biol. 10: 12-22); antígeno de carcinoma pancreático DU-PAN-2 (Lan y col., Cancer Res. 45: 305-310); antígeno de carcinoma de ovario CA125 (Hanisch y col., Carbohydr. Res. 178: 29-47); antígeno de carcinoma de pulmón YH206 (Hinoda y col., Cancer J., 42: 653-658).

Para la producción de anticuerpos policlonales en la técnica se conocen varios procedimientos. Para la producción de anticuerpos se pueden inmunizar varios animales hospedantes mediante inyección con el péptido correspondiente al epítomo deseado que incluyen, aunque sin limitación, conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. En una realización preferida, el péptido se conjuga con un vehículo inmunogénico (por ejemplo, toxoide de difteria, albúmina de suero bovino (BSA), o hemocianina de lapa de cerradura [KLH]). Se usan varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie del hospedante, que incluyen, aunque sin limitación, adyuvantes de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias superficialmente activas tales como lisolecitina, polioles tipo pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa de cerradura, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (Bacille-Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede usar cualquier técnica que provea la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas (véase por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Estas incluyen, aunque sin limitación, la técnica de hibridoma desarrollada inicialmente por Köhler y Milstein, *Nature* 256: 495-497), así como la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humano (véase por ejemplo, Kozbor y col., *Immunol. Today* 4: 72), y la técnica de hibridoma-EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96).

En una realización adicional de la invención, se pueden producir anticuerpos monoclonales en animales libres de gérmenes utilizando tecnología reciente (véase, por ejemplo PCT/US90/02545). De acuerdo con la invención, se pueden usar anticuerpos humanos y se pueden obtener usando hibridomas humanos (Cote y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030) o transformando células B con virus EBV *in vitro* (Cote y col., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, páginas 77-96).

De acuerdo con la invención, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de EE.UU. Nº 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos. Una realización adicional de la invención utiliza las técnicas descritas para la construcción de bibliotecas de expresión Fab (Huse y col., *Science* 246: 1275-1281) para permitir una rápida y fácil identificación de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

Los fragmentos de anticuerpo que contienen el idiotipo (región de unión a antígeno) de la molécula de anticuerpo pueden generarse empleando técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, aunque sin limitación, el fragmento F(ab')₂ que se puede producir mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab' que pueden generarse reduciendo los puentes de disulfuro del fragmento F(ab')₂ y los fragmentos Fab que pueden generarse tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

En la producción de anticuerpos, el escrutinio para encontrar el anticuerpo deseado puede llevarse a cabo empleando técnicas conocidas (por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzima), inmunoensayos "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitina de difusión de gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos in situ (usando oro coloidal, marcas

de enzima o de radioisótopo, por ejemplo), análisis de transferencia Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinamiento (por ejemplo, ensayos de aglutinamiento de gel, ensayos de hemaglutinamiento, etc.), ensayos de fijación de complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A, y ensayos de
5 inmunoelectroforesis, etc.).

Para el cáncer de mama, se puede atacar la superficie celular con ácido fólico, EGF, FGF y anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo) para los antígenos asociados a tumor MUC1, receptor cMet y CD56 (NCAM).

Un método muy flexible para identificar y seleccionar los grupos dirigidos de
10 péptidos adecuados es la técnica de presentación de fagos (véase por ejemplo Cortese y col., Curr. Opin. Biotechnol., 6: 73), que puede llevarse a cabo de forma conveniente usando kits disponibles comercialmente. El procedimiento de presentación de fagos produce una biblioteca combinatoria grande y diversa de péptidos unidos a la superficie de fagos, que son escrutados para encontrar receptores
15 de superficie inmovilizados para una unión fuerte. Tras la unión fuerte, se aíslan construcciones víricas y se secuencian para identificar las secuencias de péptidos. El ciclo se repite usando los mejores péptidos como puntos de partida para la siguiente biblioteca de péptidos. Finalmente, los péptidos de alta afinidad adecuados son identificados y a continuación escrutados buscando biocompatibilidad y especificidad
20 de ataque. De este modo, es posible producir péptidos que pueden conjugarse con dendrímeros, producir conjugados multivalentes con una alta especificidad y afinidad por los receptores de la célula diana (por ejemplo, receptores de célula tumoral) u otras dianas deseadas.

Relacionada con las estrategias de ataque descritas anteriormente está la
25 estrategia de “preataque” (véase por ejemplo, Goodwin y Meares, Cancer (supl.) 80: 2675). Un ejemplo de esta estrategia implica el tratamiento inicial del paciente con conjugados de anticuerpos monoclonales específicos de tumores y estreptavidina. El resto del conjugado soluble se elimina de la corriente sanguínea con un agente de eliminación biotinilado. Cuando el conjugado localizado en el tumor es todo lo que
30 queda, se introduce un agente biotinilado ligado a gosispol, que a su vez se localiza en las zonas del tumor mediante la fuerte y específica interacción biotina-estreptavidina.

En algunas realizaciones de la presente invención, los agentes dirigidos (restos funcionales) son preferiblemente ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN ó ADN). En algunas realizaciones, los restos dirigidos de ácido nucleico se diseñan para hibridarse
35 mediante emparejamiento de bases con un ácido nucleico concreto (por ejemplo, ADN

cromosomal, ARNm o ARN ribosomal). En otras realizaciones, los ácidos nucleicos se unen a un ligando o diana biológica. Se han identificado los ácidos nucleicos que se unen a las siguientes proteínas: transcriptasa inversa, proteínas Rev y Tat de VIH (Tuerk y col., Gene, 137(1): 33-9); factor de crecimiento humano (Binkley y col., Nuc. Acids Res., 23(16): 3198-205); y factor de crecimiento endotelial vascular (Jellinek y col., Biochem., 83(34): 10450-6). Los ácidos nucleicos que se unen a ligandos se identifican preferiblemente mediante el procedimiento SELEX (véase por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nº 5.475.096, 5.270.163 y 5.475.096; y las publicaciones PCT WO 97/38134, WO 98/33941 y WO 99/07724.

10

VIII. Formulaciones farmacéuticas, vías de administración y consideraciones sobre la dosificación

Para ilustrar la administración de agentes terapéuticos, la siguiente discusión se centra principalmente en la administración de compuestos de gosipol y docetaxel para el tratamiento de cáncer, sin embargo, la presente invención no pretende quedar limitada a composiciones y métodos que comprenden la administración conjunta de docetaxel con compuestos de gosipol.

La presente invención se define en las reivindicaciones y proporciona composiciones farmacéuticas que pueden comprender al menos un compuesto de gosipol, y en las realizaciones preferidas, al menos un agente anticancerígeno convencional, los compuestos de gosipol y los agentes anticancerígenos pueden administrarse en cualquier vehículo farmacéutico biocompatible esterilizado, que incluye, aunque sin limitación, disolución salina, tampón salino, dextrosa y agua. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener un agente (por ejemplo, un compuesto de gosipol). En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden contener una mezcla de al menos dos agentes (por ejemplo, compuestos de gosipol y uno o más agentes anticancerígenos convencionales). En otras realizaciones adicionales, las composiciones farmacéuticas de la presente invención contienen al menos dos agentes (por ejemplo, compuestos de gosipol y uno o más agentes anticancerígenos convencionales) que se administran a un paciente en una o más de las siguientes condiciones: a diferentes periodicidades, diferentes duraciones, diferentes concentraciones, diferentes vías de administración, etc.

Los usos médicos de la presente invención encuentran utilidad en el tratamiento de enfermedades o en la alteración de estados fisiológicos que se

caracterizan por la sobreexpresión de proteínas de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1/BFL-1 y BOO-DIVA, etc.). La invención proporciona métodos para inducir apoptosis mediante la administración de antagonistas de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, que incluyen, aunque sin limitación, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1/BFL-1 y BOO-DIVA.

La presente invención contempla el uso de compuestos de gosipol y, en algunas realizaciones, uno o más agentes anticancerígenos convencionales, de acuerdo con métodos de administración y técnicas de preparación farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, se pueden administrar compuestos de gosipol y agentes anticancerígenos adecuados a un sujeto intravenosamente en un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como suero fisiológico. Se pueden usar métodos estándares para la administración intracelular de agentes farmacéuticos (por ejemplo, administración mediante liposomas). Dichos métodos son bien conocidos por los especialistas en la técnica.

En algunas realizaciones, las formulaciones de la presente invención son útiles para administración parenteral, tal como intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal. La administración conjunta terapéutica de algunos agentes anticancerígenos contemplados (por ejemplo, polipéptidos terapéuticos) también se puede llevar a cabo usando terapia génica, tal como se ha descrito anteriormente.

Como es bien conocido en las artes médicas, la dosificación para un paciente cualquiera depende de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, su área superficial corporal, su edad, el compuesto particular que se vaya a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y la interacción con otros fármacos que se vayan a administrar concurrentemente.

Por consiguiente, en algunas realizaciones de la presente invención, se administra (-)-gosipol a un paciente solo o en combinación con uno o más agentes anticancerígenos convencionales (por ejemplo, secuencias de nucleótidos, fármacos, hormonas, etc.) o en composiciones farmacéuticas en las que se mezcla con excipiente(s) u otros vehículos farmacéuticamente aceptables. En una realización de la presente invención, el vehículo farmacéuticamente aceptable es farmacéuticamente inerte.

Dependiendo de la afección que se esté tratando, estas composiciones farmacéuticas pueden formularse y administrarse sistémica o localmente. Las técnicas de formulación y administración pueden encontrarse en la última edición de "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Co, Easton Pa.). Las rutas

adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral o transmucosal, así como administración parenteral, que incluye administración intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal o intranasal.

5 Para inyección, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la disolución de Hanks, la disolución de Ringer o salino tamponado fisiológicamente. Para la administración a tejidos o celular, en la formulación se usan los penetrantes apropiados para la barrera concreta que debe permearse. Dichos penetrantes son conocidos de forma general en la técnica.

10 En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosis adecuadas para la administración oral. Dichos vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas sean formuladas como comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y similares,
15 para la ingestión oral o nasal por parte del paciente tratado. En las realizaciones preferidas, los compuestos de gosipol son administrados oralmente a un paciente.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para lograr el propósito pretendido. Por ejemplo, una cantidad
20 efectiva de compuestos de gosipol puede ser aquella cantidad que induzca la apoptosis en una célula o tejido que presenta niveles elevados de proteína de la familia Bcl-2, en comparación con ejemplos no patológicos normales de las células o tejidos considerados. La determinación de las cantidades efectivas se encuentra dentro de la capacidad de los especialistas en la técnica, especialmente con las
25 descripciones incorporadas en la presente memoria.

Además de los ingredientes activos, las composiciones farmacéuticas preferidas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y aditivos que facilitan el procesado de los compuestos activos para formar preparaciones que puedan usarse farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas
30 para administración oral pueden darse en forma de comprimidos, grageas, cápsulas o disoluciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse de un modo que es conocido en sí mismo (por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas,
35 levigado, emulsificado, encapsulado, atrapamiento o liofilización).

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleaginosas apropiadas para inyección. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse mediante combinación de los compuestos activos (por ejemplo, compuestos de gosipol) con un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir los aditivos adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son rellenos de carbohidratos o de proteínas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata, etc.; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, o carboximetil celulosa sódica; y gomas que incluyen goma arábiga y tragacanto; y proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes o solubilizantes, tales como polivinil pirrolidona reticulada, agar, ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato sódico.

Las formulaciones digeribles de las presentes composiciones pueden incluir además cualquier material proporcionado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos para su inclusión en alimentos y sustancias que se reconocen generalmente como seguras (GRAS, del inglés “generally recognized as safe”), tales como aditivos alimentarios, aromatizantes, colorantes, vitaminas, minerales y fitonutrientes. El término fitonutrientes, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a compuestos orgánicos aislados a partir de plantas que tienen un efecto biológico, e incluye, aunque sin limitación, compuestos de las siguientes clases: isoflavonoides, proantocianidinas oligoméricas, indol-3-carbinol, sulforafona, ligandos fibrosos, fitosteroles vegetales, ácido ferúlico, antocianocidos, triterpenos, ácidos grasos omega 3/6, poliacetileno, quinonas, terpenos, catequinas, galatos y quercitina.

Los núcleos de grageas son proporcionados con recubrimientos adecuados tales como disoluciones de azúcar concentradas, que también pueden contener goma arábica, talco, polivinil pirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca, y disolventes o mezclas de disolventes orgánicos adecuados. Se
5 pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o a los recubrimientos de las grageas para identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo (es decir, la dosis).

Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse oralmente incluyen cápsulas “push-fit” (de cierre a presión) hechas de gelatina, así como cápsulas
10 blandas selladas hechas de gelatina y un recubrimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas push-fit pueden contener los ingredientes activos mezclados con un relleno o con aglomerantes tales como lactosa o almidones, con lubricantes tales como talco o estearato magnésico, y opcionalmente con estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales
15 como aceites grasos, parafinas líquidas o polietilenglicol líquido, con o sin estabilizantes.

Pueden prepararse composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un vehículo farmacéuticamente aceptable, se colocan en un recipiente adecuado y se marcan para el tratamiento de una afección indicada. Para
20 los compuestos de gosipol, las afecciones indicadas en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de afecciones relacionadas con una regulación defectuosa de la apoptosis, enfermedades hiperproliferativas, cánceres, síndrome de deficiencia inmune adquirida (SIDA), afecciones degenerativas y enfermedades vasculares. Las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse en forma de sal y se pueden formar con muchos
25 ácidos, que incluyen, aunque sin limitación, clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos o próticos que las correspondientes formas de base libre. En otros casos, la preparación preferida puede ser un polvo liofilizado en histidina 1 mM-50 mM, sacarosa al 0,1%-2%, manitol al 2%-7%, en un intervalo de pH de 4,5 a 5,5, que se
30 combina con un tampón antes de ser usado.

Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente mediante ensayos de cultivo celular. Entonces, preferiblemente, se puede formular la dosis en modelos de animales (particularmente modelos murinos) para lograr un intervalo de concentraciones en
35 circulación deseable que induzca la apoptosis en células con niveles elevados de

proteínas de la familia Bcl-2. Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad de compuestos de gossipol (y en algunas realizaciones de uno o más agentes anticancerígenos convencionales) que alivian los síntomas del estado deseado (por ejemplo, enfermedades de proliferación celular no regulada, que incluyen, aunque sin limitación, cáncer). La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y los terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como el cociente LD₅₀/ED₅₀. Son preferibles los compuestos que presentan índices terapéuticos elevados. Los datos obtenidos a partir de los ensayos con cultivos celulares y de estudios adicionales con animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación, por ejemplo, para uso en mamíferos (por ejemplo, humanos, *Equus caballus*, *Felis catus* y *Canis familiaris*, etc.). La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferiblemente en el intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la ED₅₀ con poca o nula toxicidad, aunque la presente invención no se limita a dicho intervalo. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosis empleada, de la sensibilidad del paciente y de la ruta de administración.

La dosis exacta es elegida por el médico correspondiente en función del paciente tratado. La dosis y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del resto activo o para mantener el efecto deseado. Los factores adicionales que deben tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado de enfermedad, la edad, el peso y el género del paciente, la dieta, la duración y frecuencia de administración, la(s) combinación(es) de fármacos, las reacciones alérgicas y la tolerancia/respuesta a la terapia. Las composiciones de larga duración podrían administrarse cada 3-4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas dependiendo de la vida media y la tasa de eliminación de la formulación concreta. Otras composiciones farmacéuticas pueden administrarse diariamente o varias veces al día.

Las cantidades por dosis normales pueden variar entre 0,1 y 100.000 microgramos, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, dependiendo de la vía de administración. En la bibliografía se dispone de guías para dosificaciones y métodos de administración concretos (véanse las Patentes de EE.UU. Nº 4.657.760, 5.206.344

ó 5.225.212). La administración de agentes a la médula ósea de un paciente puede necesitar una administración en una forma diferente a las inyecciones intravenosas.

Las realizaciones preferidas de la presente invención proporcionan composiciones farmacéuticas y usos médicos para administrar una cantidad efectiva
5 de (-)-gosipol a un paciente para inhibir la proliferación celular (por ejemplo, de células cancerosas). En algunas otras realizaciones preferidas, la presente invención además proporciona composiciones farmacéuticas y usos médicos para administrar conjuntamente una cantidad efectiva de al menos un agente anticancerígeno convencional además del (-)-gosipol a un paciente, de tal modo que se inhibe la
10 proliferación celular (por ejemplo, de células cancerosas).

En las realizaciones preferidas, el sujeto padece una enfermedad que se caracteriza por la sobreexpresión de una proteína de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1/BFL-1 y BOO-DIVA, etc.). En algunas realizaciones, las enfermedades caracterizadas por la sobreexpresión de una proteína de la familia Bcl-2
15 incluyen, aunque sin limitación, enfermedades hiperproliferativas y cánceres. En otras realizaciones adicionales, los cánceres adecuados para el tratamiento con las composiciones y métodos de la presente incluyen, aunque sin limitación, cáncer de mama, cáncer de próstata, linfoma, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer de colon, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, cáncer de hígado, cáncer de
20 vejiga, cáncer de pulmón no pequeño, carcinoma cervical, mieloma, carcinoma adrenal, leucemia, neuroblastoma y glioblastoma. Sin embargo, la presente invención no pretende estar limitada al tratamiento de ningún tipo particular de cáncer.

En algunas realizaciones, las enfermedades sospechosas de caracterizarse por tener niveles elevados de proteína(s) de la familia Bcl-2 adecuadas para el tratamiento
25 mediante la presente invención son seleccionadas obteniendo una muestra de interés (por ejemplo, células, tejidos, fluidos, etc.) sospechosa de presentar niveles elevados de proteínas de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1/BFL y BOO-DIVA, etc.), medir los niveles de proteínas de la familia Bcl-2 en la muestra usando una o más técnicas inmunohistoquímicas bien establecidas (por ejemplo, ELISA o
30 análisis de transferencia Western, etc.), y comparar los niveles de proteínas de la familia Bcl-2 en la muestra con los niveles de proteínas de la familia Bcl-2 en muestras no patológicas de referencia relevantes. En otras realizaciones, las enfermedades sospechosas de caracterizarse por presentar niveles elevados de una o más proteínas de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1/BFL-1 y BOO-DIVA, etc.) se
35 seleccionan comparando los niveles de uno o más marcadores (por ejemplo,

polinucleótidos, polipéptidos, lípidos, etc.) en una muestra (por ejemplo, células, tejidos, fluidos, etc.) que indican directa o indirectamente los niveles elevados de proteínas de la familia Bcl-2 en la muestra, en comparación con los niveles de dichos marcadores en muestras no patológicas relevantes. En otras realizaciones adicionales, las enfermedades sospechosas de caracterizarse por presentar niveles elevados de proteínas de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1/BFL-1 y BOO-DIVA, etc.) se seleccionan a partir de enfermedades que no responden o que dejan de responder al tratamiento con una o más terapias contra el cáncer convencionales (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia y/o intervención quirúrgica).

10 La presente invención no pretende estar limitada por las vías de administración de agentes a un sujeto seleccionadas. De hecho, se contemplan una serie de rutas de administración adecuadas cuya selección queda en manos del especialista en la técnica.

En algunas realizaciones preferidas, el (-)-gosipol administrado a un paciente a un intervalo de dosis de aproximadamente 1 a 200 mg/día, entre aproximadamente 5 y 50 mg/día, y más preferiblemente entre aproximadamente 10 y 40 mg/día. En las realizaciones particularmente preferidas, el (-)-gosipol se administra a un paciente (por ejemplo, oralmente) en una dosis diaria tolerable (por ejemplo, de 30 a 40 mg/día) que ha demostrado tener algo de actividad biológica (por ejemplo, alteraciones en los niveles de Rb y Ciclina D1).

En otras realizaciones preferidas los taxanos (por ejemplo, docetaxel) se administran a un paciente en combinación con (-)-gosipol. El esquema de dosis de docetaxel clásico es de 80-100 mg/m² q 3 semanas. Sin embargo, estudios recientes sugieren que los taxanos pueden administrarse con seguridad quizás con una intensidad de dosis mayor, en un esquema semanal q. (Véase por ejemplo, J. D. Hainsworth y col., J. Clin. Oncology, 16: 2164-2168; J. D. Hainsworth y col., J. Clin. Oncology, 19: 3500-3505; y C. Kouroussis y col., Cancer Chemo. Pharm., 46: 488-492). Las toxicidades de paciente asociadas a la administración de taxanos incluyen neutropenia, astenia, alopecia, reacciones alérgicas, toxicidad para la piel y edema. Las realizaciones preferidas de la presente invención proporcionan administraciones semanales de taxanos para reducir las toxicidades en pacientes a la vez que se preserva la eficacia del agente. En otras realizaciones, se espera que la administración de taxanos (por ejemplo, docetaxel) con una frecuencia superior a una vez por semana durante el curso del tratamiento de un paciente con el (-)-gosipol descrito produzca efectos sinérgicos.

Aunque la presente invención no está limitada a ningún mecanismo particular, ni al conocimiento de la acción de los agentes que se administran, el siguiente ejemplo proporciona una descripción de un ejemplo de procedimiento de ensayo usado para determinar interacciones potenciales de fármaco entre el (-)-gospol y uno o más agentes anticancerígenos que sean candidatos para la administración conjunta con gospol.

El docetaxel es ampliamente metabolizado por la CYP3A4, una enzima p450 citocromo específica. Los datos farmacocinéticos obtenidos con docetaxel indican una amplia variación en su eliminación entre los diferentes pacientes. Una mala eliminación de docetaxel puede producir un aumento en el área-bajo-la-curva (AUC, del inglés “area-under-the-curve”) y por tanto una mayor toxicidad en el paciente. Varias investigaciones han publicado que el gospol disminuye P-450 y oxidasas de función mixta, aunque estos resultados son dudosos y no se han realizado estudios en humanos que aborden específicamente este tema. Por tanto, es posible que el gospol pueda inhibir la actividad de CYP3A4 y conduzca a una acumulación de docetaxel tóxico en algunos pacientes.

En una realización, se administra a un paciente una dosis diaria de gospol durante 1 semana antes de recibir su primera dosis de docetaxel. El perfil farmacocinético del docetaxel en el sistema del paciente se evalúa después de que el paciente reciba su primera dosis de docetaxel. (Véase, R. Bruno y col., J. Clin. Oncol., 16: 187-196). La dosificación de docetaxel se inicia con una dosis reducida de aproximadamente 15 mg/m²/semana. La dosis de docetaxel se aumenta gradualmente hasta una dosis tolerada máxima de aproximadamente 35 mg/m²/semana. Simultáneamente, se recoge información sobre los efectos de la administración de gospol sobre la expresión fenotípica de CYP3A4.

La expresión fenotípica de CYP3A4 puede medirse de manera fácil y reproducible usando un ensayo de respiración de eritromicina (ERMBT, del inglés “erythromycin breath test”). (Véase por ejemplo P. Watkins, Pharmacogenetics, 4: 171-184, y J. Hirth y col., Clin. Cancer Res., 6: 1255-1258). Se ha demostrado que el ensayo ERMBT predice un estado estacionario a través de los niveles sanguíneos de fármacos que son sustratos de CYP3A4. Por consiguiente, algunas realizaciones de la presente invención están dirigidas a la administración conjunta de (-)-gospol y taxanos (por ejemplo, docetaxel) usando el ERMBT para determinar las interacciones potenciales de fármacos entre el gospol y el docetaxel. Los especialistas en la técnica apreciarán que se pueden utilizar varias metodologías de ensayo similares para

determinar interacciones potenciales entre los compuestos de gossipol y los compuestos candidatos para la administración conjunta.

En algunas realizaciones, se emplean técnicas inmunohistoquímicas estándares con muestras obtenidas de pacientes después de, o durante, tratamientos con los métodos y composiciones de la presente invención para determinar cambios en los niveles de proteínas de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-X_L y Bax, etc.). Por ejemplo, en algunas realizaciones se usan técnicas inmunohistoquímicas que usan anticuerpos de Bcl-2 (DAKO, Carpinteria, CA), Bcl-X_L y/o Bax (Zymed, Sur de San Francisco, CA) para determinar los niveles de estas proteínas Bcl-2 en muestras de pacientes. En las realizaciones preferidas los resultados de estudios inmunohistoquímicos se interpretan usando criterios bien conocidos por los especialistas de la técnica, considerándose cualquier tinción citoplásmica o nuclear positiva. Los niveles de expresión Bcl-2, Bcl-X_L y Bax se determinarán mediante el recuento de al menos 1.000 células neoplásicas en cada caso, y se expresan como un porcentaje. La expresión se considerará alta cuando el porcentaje de células positivas sea > 25% para Bcl-2 y Bcl-X_L, y > 50% para Bax. (Véase, por ejemplo, G. Rassidakis y col., Amer. J. Path., 159: 527-535 (2001), y S. Shi y col., J. Histochem. Cytochem., 39: 741-748). En otras realizaciones, se obtendrán muestras intermitentes de sangre entera para análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, del inglés “fluorescence activated cell sorting”) para determinar la expresión de Bcl-2 y Bcl-X_L en linfocitos sanguíneos periféricos (PBLs, del inglés “peripheral blood lymphocytes”) y para realizar la selección inmunomagnética de células epiteliales en circulación.

En realizaciones preferidas, el punto final primario de los estudios de dosificación se obtiene cuando se establece la dosis tolerada máxima de compuesto de gossipol (para una dosis diaria concreta, por ejemplo, 30 mg/día) administrada en combinación con un candidato de terapia anticancerígena de combinación. En algunas realizaciones, la toxicidad limitante de dosis (DLT, del inglés “dose-limiting toxicity”) se establece cuando una muestra dada (por ejemplo, una muestra de célula, tejido o fluido) presenta > 500 neutrófilos o cualquier otra toxicidad que sea de Grado 3 ó 4 en cualquier momento mientras el paciente está siendo estudiado.

En algunas otras realizaciones, para evaluar el escalado de la dosis se requiere un mínimo de 9 semanas de tratamiento para 2 pacientes que empiecen en cada nivel de dosis. La dosis máxima tolerada (MTD) se define como la dosis a la cual el 33% de los pacientes experimentan la DLT. Si no se alcanza la MTD para una dosis particular,

entonces dicho nivel de dosis se define como la MTD. En las realizaciones preferidas, las dosis se adjudican a los pacientes de acuerdo con los criterios descritos en el Continual Reassessment Method (J. O'Quigley y col., Biometrics 46: 33-48) denominado Time-to-Event CRM ó TITE-CRM. (K. Cheung y R. Chappel, Biometrics [en prensa]). Brevemente, el método TITE-CRM supone un modelo para el tiempo de aparición de la respuesta de toxicidad en función de la dosis, y permite emplear información de los pacientes reclutados en el ensayo cuando se adjudica un nivel de dosis a un paciente nuevo. Dado que este método es muy flexible en términos de número de pacientes tratados con cada dosis, los sujetos pueden ser reclutados continuamente a lo largo del ensayo, sin pausas de reclutamiento, siempre que los pacientes sean tratados a una dosis consistente con el perfil de seguridad.

En las realizaciones preferidas, después del tratamiento las células y tejidos enfermos son sometidos a ensayos para determinar la viabilidad celular, la inducción de apoptosis, tal como, cambios morfológicos, integridad de ADN, rutas de mitocondria, alteraciones de expresión de proteínas de la familia Bcl-2 y activación de caspasa, así como efectores por encima y por debajo de caspasas e inhibidores de caspasa. Los especialistas en la técnica serán capaces de diseñar y ejecutar con facilidad ensayos para evaluar éstos y otros cuantos parámetros celulares y bioquímicos en las células y tejidos tratados.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar e ilustrar con mayor profundidad determinadas realizaciones preferidas de la presente invención, y no deben considerarse como limitantes del alcance de la misma. La invención se define en las reivindicaciones.

Ejemplo 1

Modelización de la homología

La secuencia de Bcl-2 humana fue obtenida de Gene Bank (entrada gi4557355) (SEC ID N°: 1). Como plantilla se usó la estructura de RMN de la Bcl-X_L (código pdb: 1BXL del banco de datos de proteínas), que tiene un 45% de identidad de secuencia de aminoácidos, un 56% de similitud de secuencia y un 3% de huecos con respecto a la Bcl-2. Se construyó la estructura de la Bcl-2 usando el programa de modelización de homología MODELLER (versión 4.0). (A. Sali y col., Structure, Function, and Genetics, 23: 318-326; y A. Sali, Curr. Opin. Biotech., 6: 437-451). Se

realizó un refinado posterior usando el programa de dinámica molecular CHARMM (versión 27b2). (B.R. Brooks, J. Comput. Chem., 4: 187-217). Se asignaron átomos de hidrógeno a la estructura modelada usando el programa QUANTA (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA). El péptido BH3 de Bak fue colocado en el sitio de unión del dominio BH3 de la Bcl-2 con la misma orientación que en la estructura de RMN de la Bcl-XL en complejo con el péptido BH3 de Bak (1BXL en el banco de datos de proteínas). (S. Michael y col., Science, 275: 983-986). Se solvató la estructura del complejo insertándola en una esfera de agua TIP3P de 60 Å de diámetro y eliminando las moléculas de disolvente que tenían átomos pesados a menos de 2,5 Å de cualquier átomo pesado de la proteína.

Se llevó a cabo la simulación MD usando el conjunto de parámetros de todos los átomos del campo de fuerza de MSI CHARMM (ref. 23) en QUANTA 98, una constante dieléctrica, $\epsilon = 1$ y una temperatura constante, $T = 300$ K. Se aplicó el método de salto de rana con un paso de tiempo de 1 fs para la integración numérica. Las fuerzas electrostáticas de largo alcance fueron tratadas con el método de cambio de fuerza con un intervalo de cambio de 8-12 Å. (Véase, B.R. Brooks y col., J. Comput. Chem., 4: 187-217). Las fuerzas de van der Waals fueron calculadas con el método de cambio y un corte de 12 Å. La lista de no enlace se mantuvo a 14 Å y se actualizó euristicamente. El agua disolvente se mantuvo sin evaporar usando el potencial de campo variado esférico tal como se implementa en CHARMM. (B.R. Brooks, ver anterior). La proteína solvatada fue minimizada en energía usando 100 ciclos usando el método Steepest Descent y otros 1000 ciclos adicionales usando el método Adopted-Basis Newton Raphson. Después se realizó una simulación MD de 3,0 ns. La simulación se llevó a cabo en un ordenador Origin2000 en el Advanced Biomedical Computing Center del National Institute of Health.

Ejemplo 2

Expresión y purificación de la proteína Bcl-X_L

Se sobreexpresó la proteína Bcl-X_L recombinante con una etiqueta His-tag N-terminal del vector de expresión pET15b (Novagen, Darmstadt, Alemania). En esta construcción, se eliminó la región de anclaje a membrana putativa C-terminal (residuos 214-237) y un lazo entre la hélice 1 y la hélice 2 (residuos 49-88) para facilitar la purificación de la proteína. Previamente se demostró que dicho lazo es prescindible para la actividad anti-apoptótica de la proteína. (Véase, S.W. Muchmore y col., Nature,

381: 335-341. La actual construcción de Bcl-X_L produce aproximadamente 20 mg de la proteína Bcl-X_L purificada a partir de un 1L de cultivo celular.

Se marcó uniformemente con ¹⁵N a las muestras de proteína para los estudios de RMN del escrutinio, y se marcó doblemente de forma uniforme con ¹⁵N y con ¹³C para la caracterización de la estructura de acuerdo con los métodos descritos en M. Jansson y col., J. Biomol. NMR, 7: 131-141 (1996), y M.L. Cai y col., J. Biomol. NMR, 11: 97-102 (1998).

Ejemplo 3

10 Expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en células cancerosas humanas

Se seleccionaron varias líneas de células cancerosas (Tabla 3) que expresan varios niveles de proteínas Bcl-2 y/o Bcl-X_L con el objetivo de evaluar la actividad del gosipol para inhibir la proliferación de células cancerosas humanas.

15 **Tabla 3**

	Línea de Células Cancerosas	Expresión de Bcl-2	Expresión de Bcl-X _L
Grupo I	Cáncer de mama MDA-453,	±	+++
	Cáncer de mama T47	-	+++
Grupo II	Cáncer de mama MDA-453	+++	±
Grupo III	Cáncer de mama MDA-231	+++	+++
Grupo IV	WI-38 normal	-	-
	Melanoma SK-MEL-28	±	-

Los experimentos que usan líneas de células cancerosas bien caracterizadas mostrados en la Tabla 3 permiten la evaluación de varias características importantes del gosipol como agente anticancerígeno potencial. En primer lugar, es de esperar que la actividad y la selectividad del gosipol en ensayos de unión con una serie de tipos de células cancerosas que expresan diversos niveles de proteínas de la familia Bcl-2 indiquen el abanico de tipos de cánceres que son candidatos adecuados para el tratamiento con gosipol. En segundo lugar, la evaluación de gosipol en células cancerosas con niveles elevados de Bcl-2 y niveles elevados de Bcl-X_L indicará si la inhibición de una proteína sola es suficiente para la inducción de apoptosis o si la inhibición simultánea de ambas proteínas logrará una potencia mayor. En tercer lugar,

los ensayos que usan una serie de tipos de células cancerosas que expresan diversos niveles de proteínas de la familia Bcl-2 indicarán si el gossipol presenta selectividad en células cancerosas con baja expresión de Bcl-2 y de Bcl-X_L.

5 **Ejemplo 4**

Ensayos de unión basados en polarización de fluorescencia

La presente invención usa un ensayo *in vitro* establecido de unión basado en polarización de fluorescencia (PF) sensible y cuantitativo para determinar la afinidad de unión *in vitro* de inhibidores de molécula pequeña (por ejemplo, compuestos de gossipol) a Bcl-2 y Bcl-X_L (véase, por ejemplo, J.L. Wang y col., Cancer Res., 60: 1498-1502; J.L. Wang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 7124-7129; A. Degterev y col., Nat. Cell Biolog., 3: 173-182; e I.J. Enyedy y col., J. Med. Chem., 44: 4313-4324). Este ensayo monitoriza el desplazamiento de un péptido de dominio BH3 marcado fluorescentemente a partir de proteína recombinante Bcl-2 o Bcl-X_L. Una vez que el péptido se une a la proteína Bcl-2 o Bcl-X_L, la polarización de fluorescencia aumenta. Cuando un inhibidor de molécula pequeña se une a Bcl-2 o Bcl-X_L y desplaza al péptido de dominio BH3 marcado fluorescentemente, la polarización de fluorescencia disminuye. La determinación de las afinidades de unión a ambas proteínas es importante para determinar su selectividad. Aunque las estructuras de la Bcl-2 y la Bcl-X_L son muy similares, existen determinadas diferencias entre las dos proteínas. Un inhibidor de molécula pequeña de Bcl-2/Bcl-X_L puede presentar cierta selectividad entre las dos proteínas. Por tanto, la unión de gossipol a Bcl-2 y Bcl-X_L se determina además y se confirma usando los métodos de RMN descritos en la presente memoria.

El escrutinio inicial de inhibidores de Bcl-2 (por ejemplo, gossipol, enantiómeros, derivados y sales farmacéuticamente aceptables del mismo) se lleva a cabo a 200 µM. Si se observa una inhibición significativa para un inhibidor (superior al 50%), su valor IC₅₀ se determina. Se añaden cinco mL del compuesto de ensayo en tampón de reacción a pocillos que contienen trazador y proteína Bcl-2 o Bcl-X_L en la misma concentración. La concentración final de DMSO en todos los compuestos debería ser inferior al 0,5%. La lectura final se toma tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente. Para la determinación de la IC₅₀ de los compuestos activos iniciales, se usan de 9 a 10 concentraciones entre 1 nM y 200 µM. El péptido de Bak no marcado se usa como control positivo, mientras que como control negativo se usa un compuesto inactivo.

En una realización, los ensayos de polarización de fluorescencia de Bcl-2 fueron llevados a cabo como se indica a continuación. Se sintetizó el trazador peptídico Flu-Bak-BH3 16-mero marcado con fluoresceína (secuencia GQVGRQLAIIGDDINR (SEC ID N°: 2) derivada del dominio BH3 de Bak) y se marcó en el extremo amino. La proteína Bcl-2 fusionada a GST soluble recombinante de 46 kDa se compró a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 μ L por pocillo que contenían 10 μ L de 1X tampón salino de fosfato, 5 μ L de proteína GST-Bcl-2 y 5 μ L de trazador peptídico. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La lectura se tomó a 485 nm y 535 nm usando el lector Ultra Reader (Tecan U.S. Inc., Research Triangle Park, NC). Se llevaron a cabo una serie de experimentos de validación analizando las señales máxima y mínima obtenidas con el ruido de fondo, el tampón, la proteína Bcl-2, el trazador y la mezcla de proteína Bcl-2 y trazador. Se determinó la K_d de unión entre la proteína Bcl-2 y el péptido 16-mero marcado con fluoresceína mediante valoración de la proteína Bcl-2 a un intervalo de concentración de 5,4 nM a 540 nM, y un intervalo de concentración de trazador fluorescente de 0,145 nM a 1.450 nM. La unión óptima se obtuvo a una concentración final de 290 nM del trazador fluorescente y de 270 nM de la proteína Bcl-2. Para verificar la especificidad, se comparó la unión del péptido marcado fluorescentemente con la del péptido 16-mero no marcado. Los datos indican que el péptido 16-mero no marcado fue capaz de anular la unión del trazador marcado, con una IC_{50} de aproximadamente 0,3 μ M, un valor similar al valor publicado en bibliografía.

El escrutinio inicial de gosipol y análogos de gosipol se llevó a cabo a 200 μ M. Se añadieron cinco microlitros del compuesto de ensayo en tampón de reacción a cada uno de los pocillos que contenían trazador y proteína Bcl-2 a la misma concentración determinada anteriormente. La concentración final de DMSO en todos los compuestos fue inferior al 1%. La lectura final se tomó después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente. Para la determinación de la IC_{50} de los compuestos activos, se realizaron de 6 a 7 diluciones por triplicado comenzando a 200 μ M.

Células y reactivos. Las líneas de células de mama humanas (T47D, MDA-231, MDA-453), y las células de Leucemia HL-60 fueron obtenidas en la American Type Culture Collection (ATCC). Todas las líneas tumorales fueron cultivadas y mantenidas en medio RPMI 1640 que contenía un 10% de FCS, excepto la de MDA-MB-231 que

usó medio Eagle modificado de Dulbecco como medio basal. Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora humidificada a 37°C y un 5% de CO₂.

Ejemplo 5

5 Confirmación de la unión de gosipol a Bcl-X_L mediante RMN

La unión de gosipol a Bcl-X_L se determinó usando técnicas de RMN de alta resolución. Puesto que los experimentos de RMN se llevaron a cabo a pH 7,2, se usó un gradiente de campo de pulso (PGF) HSQC con retirada de agua ("water flip back") para maximizar la intensidad de la señal (S. Grzesiek y A. Bax, J. Am. Chem. Soc., 115: 12593-12594; y G.S. Sheppard y col., Abstracts of Papers of the Amer. Chem. Soc., 213: 81) y para minimizar la destrucción de la señal de agua. Se registraron los espectros HSQC de Bcl-X_L antes (Bcl-X_L libre) y después de la adición de la disolución de inhibidor concentrada. A continuación se compararon los dos espectros para identificar los desplazamientos químicos inducidos por las adiciones del inhibidor. El procesamiento de datos se llevó a cabo usando el software nmrPipe, pipp y nmrDraw (véase D.S. Garrett y col., J. Magn. Reson. Ser., B 95: 214-220, y F. Delaglio y col., J. Biomol. NMR, 6: 277-293). Los picos desplazados fueron contrastados con la tabla de asignaciones para revelar los residuos afectados por la presencia de los inhibidores.

20 Ejemplo 6

Determinación de la afinidad de unión de gosipol a Bcl-X_L mediante RMN

Se llevaron a cabo experimentos HSQC similares de Bcl-X_L para obtener la afinidad de unión de un inhibidor de molécula pequeña mediante la valoración de su concentración desde nM a mM. Puesto que los inhibidores de molécula pequeña se unen a la proteína Bcl-X_L en el límite del intercambio rápido en la escala de tiempo de RMN, algunos desplazamientos de picos se producen de un modo secuencial hacia las posiciones de desplazamiento máximo con cantidades crecientes de los inhibidores. El cambio en los valores de desplazamiento químico frente a la concentración de un inhibidor se analiza para obtener su valor de K_d. (Véase, por ejemplo, P.E. Johnson y col., Biochemistry, 35: 13895-13906).

Ejemplo 7

Investigaciones sobre los mecanismos de apoptosis inducida por gosipol

Se lleva a cabo una serie de ensayos bioquímicos para determinar los mecanismos de acción de los compuestos de gosipol como inhibidores de molécula

pequeña de las proteínas de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2 y/o Bcl-X_L). Aunque no es necesario comprender el mecanismo para llevar a la práctica la presente invención, y la presente invención no queda limitada por ello, se contempla que un conocimiento de los mecanismos mediante los cuales los compuestos de gossipol actúan sobre células y tejidos que sobreexpresan proteínas de la familia Bcl-2 se ventajoso para la presente invención.

Se determina el estado de expresión y fosforilación de las proteínas Bcl-2 en las células tratadas con compuestos de gossipol a diferentes dosis y tiempos. En particular, se pueden determinar los niveles de expresión de Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-Xs, Bak, Bad, Bax, Bid mediante anticuerpos específicos usando análisis de transferencia Western. El estado de fosforilación correspondiente a proteínas tales como Bcl-2, Bcl-X_L y Bad se determina con el análisis de transferencia Western usando anticuerpos específicos que reconocen las proteínas fosforiladas.

Los efectos del gossipol sobre las mitocondrias celulares se examinarán a través de varios métodos. Los dos ensayos más importantes son los ensayos de liberación de citocromo c y de formación de poros. Las células son tratadas con inhibidores durante 24-48 horas y se lleva a cabo un fraccionamiento celular tal como se describe en R.M. Kluck y col., Science, 275: 1132-1136 (1997) con alguna modificación. Brevemente, las células son cosechadas y lavadas una vez con PBS enfriado en hielo y se vuelven a suspender en 1 mL de tampón C enfriado en hielo (Hepes-KOH 10 mM a pH 7,4, NaCl 0,42 M, 2,5% (v/v) de glicerol, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA sódico 0,5 mM, EGTA 0,5 mM, ditiotretitol 1 mM) y una mezcla de inhibición de proteasa (PIM). La suspensión celular se homogeniza en hielo haciéndola pasar 15 veces a través de una aguja de medida 22. Los homogenatos se centrifugan dos veces a 750g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los núcleos. Las fracciones sobrenadantes post-nucleares se centrifugan a 10.000g durante 15 minutos a 4°C, y las partículas enriquecidas en mitocondrias resultantes se vuelven a suspender en 100 mL de tampón C + PIM (fría). El sobrenadante post-mitocondrial se centrifuga a 10.000g durante 1 hora a 4°C para eliminar los contaminantes de membrana, y el sobrenadante resultante (porción soluble) se usa para la detección de liberación de citocromo-c citosólico, la partícula es la porción de membrana mitocondrial (proteínas de membrana pesadas). Las proteínas de la fracción soluble y una cantidad equivalente de proteínas de membrana pesadas son sometidas a SDS-PAGE y analizadas mediante análisis de transferencia Western con anticuerpos contra citocromo c (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Calbiochem, La Jolla, CA), Smac y AIF

(factor de inducción de apoptosis) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Esto determina la señalización de apoptosis después del tratamiento de las células (por ejemplo, células cancerosas) con compuesto de gossipol a través de tres de las rutas mitocondriales: liberación de cito-c, liberación de Smac y liberación de AIF.

5 La activación de caspasas se determina cosechando y lavando las células tratadas con PBS y suspendiéndolas en HEPES 25 mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 5 mM, ditionona 5 mM, fluoruro de fenilmetanosulfonilo 2 mM, 10 g/L de pepstatina A y 10 g/mL de leupeptina, tras tratamiento. A continuación las células son lisadas. Los lisatos celulares son clarificados mediante centrifugación a 12.000xg durante 20 minutos a 4°C. Se determina la actividad de caspasa-1, -2, -3, -6, -8 y -9 en el sobrenadante mediante el Sistema de Ensayo fluorogénico CaspACE (Promega Corp., Madison, WI). Brevemente, 50 mg de proteína total, determinada mediante ensayo de ácido bicinonínico (Promega Corp.), son incubados con 50 mM de sustrato Ac-YVAD-AMC, Ac-VDVAD-AMC, Ac-DEVD-AMC, Ac-VEID-AMC, Ac-IETD-AMC ó Ac-LEHD-AMC a 30 C durante 1 hora. Se mide la liberación de metilcumaril-7-amina (AMC) mediante excitación a 360 nm y emisión a 460 nm usando un espectrofotómetro de fluorescencia (Hitachi F-4500) de acuerdo con G. Denecker y col., Cell Mol. Life Sci., 58: 356-370 (2001), y V.M. Kolenko y col., Apoptosis, 5: 17-20).

20 Los efectos de los inhibidores de caspasa (por ejemplo, Z-VAD-FMK, no específico, Z-DEVD-FMK, caspasa-3, -6, -7, -8 y -10, y Z-LEHD-FMK, caspasa-9) sobre la actividad de los compuestos de gossipol usando ensayos de inhibidor de caspasa estándares. Todas estos inhibidores de caspasa se encuentran disponibles comercialmente (Enzyme System Products, Livermore, CA).

25 **Ejemplo 8**

Ensayo de supervivencia celular

Se siembran células en placas de 24 o de 96 pocillos y se preparan compuestos de gossipol en diluciones 2-10 a 1 en medio. Se determina la inhibición de la viabilidad de celular mediante el tratamiento de las células con los compuestos de gossipol durante 24 horas y se determina mediante el ensayo de tripano-azul. Se determina la inhibición del crecimiento celular mediante el tratamiento de las células con los inhibidores durante 3-6 días y se determina mediante el ensayo MTT.

35 El ensayo MTT es una metodología rápida, precisa y fiable para obtener medidas de viabilidad celular. El ensayo MTT fue desarrollado por primera vez por Mosmann (Mosmann, J. Immunol. Meth., 65: 55). Es un ensayo colorimétrico simple

que han utilizado muchos laboratorios para obtener resultados de toxicidad (véase, por ejemplo, Kuhlmann y col., Arch. Toxicol., 72: 536). Brevemente, las mitocondrias producen ATP para proporcionar suficiente energía para la célula. Para poder hacer esto, la mitocondria metaboliza piruvato para producir acetil CoA. Dentro de la

5 mitocondria el acetil CoA reacciona con varias enzimas en el ciclo del ácido tricarboxílico dando como resultado la consiguiente producción de ATP. Una de las enzimas particularmente útil en el ensayo MTT es la succinato deshidrogenasa. El MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2 difenil tetrazolio bromuro) es un sustrato amarillo que es atacado por la succinato deshidrogenasa formando un producto de formazano

10 púrpura. La alteración de la pigmentación identifica cambios en la función mitocondrial. Las células no viables son incapaces de producir formazano, y por tanto la cantidad producida se correlaciona directamente con la cantidad de células viables. La absorbancia a 450 nm se utiliza para medir la cantidad de producto de formazano.

Los resultados de los ensayos *in vitro* pueden compararse con los ensayos de

15 toxicidad *in vivo* con el fin de extrapolar a condiciones de animal vivo. Normalmente, se determina la toxicidad aguda de una dosis sencilla de la sustancia. En algunas realizaciones, los animales son monitorizados durante 14 días en busca de cualquier señal de toxicidad (temperatura incrementada, dificultad respiratoria, muerte, etc.). Tradicionalmente, el estándar de la toxicidad aguda es la dosis letal media (LD₅₀), que

20 es la dosis predicha a la cual la mitad de la población tratada moriría. La determinación de esta dosis se produce exponiendo animales de ensayo a una serie geométrica de dosis en condiciones controladas. Otras pruebas incluyen el ensayo de toxicidad subaguda, que mide la respuesta del animal a dosis repetidas del compuesto de gosipol (o de uno o más agentes anticancerígenos convencionales) durante no más de

25 14 días. El ensayo de toxicidad subcrónica implica probar una dosis repetida durante 90 días. El ensayo de toxicidad crónica es similar al ensayo subcrónico pero puede durar más de 90 días. También pueden llevarse a cabo ensayos *in vivo* para determinar la toxicidad con respecto a determinados tejidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, se determina la toxicidad de tumor (es decir, el

30 efecto de las composiciones de la presente invención sobre la supervivencia de tejido tumoral) (por ejemplo, mediante la detección de cambios en el tamaño y/o crecimiento de los tejidos tumorales).

Después del tratamiento de las células con inhibidores, se realizan determinaciones cualitativas de la morfología celular para determinar características

relacionadas con la apoptosis tal como hinchamiento celular, hinchamiento nuclear, “blebbing” de la membrana, vacuolización y formación de cuerpos apoptóticos.

En algunas realizaciones, la detección del nivel de ADN de apoptosis se hace detectando la fragmentación de ADN usando el ensayo TUNEL. Cuando las células
5 están siendo sometidas a apoptosis, las endonucleasas apoptóticas no afectan solo al ADN celular produciendo la escalera de ADN clásica sino que también generan grupos 3'-OH libres en los extremos de dichos fragmentos de ADN. Estos grupos son marcados en los extremos con el kit de Fragmentación de ADN TdT-FragFLTM (Oncogene, Boston, MA) permitiendo la detección de células apoptóticas usando
10 técnicas basadas en biología molecular, de marcado en los extremos, histoquímicas o histoquímicas. La razón de este ensayo es que la desoxinucleotidil transferasa (TdT) terminal se une a los extremos 3'-OH expuestos de los fragmentos de ADN generados en respuesta a las señales apoptóticas, y cataliza la adición de dioxsinucleótidos marcados con biotina y no marcados. Los nucleótidos biotinilados son detectados
15 usando un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano (HRP). La diaminobencidina reacciona con la muestra marcada para generar un sustrato coloreado insoluble en el sitio de la fragmentación de ADN. (Véase, por ejemplo, L. Lagneaux y col., Br. J. Haematol., 112: 344-352 (2001); y K. Kitamura, Leukemia, 14: 1743-1750).

20 En otras realizaciones, se usaron métodos de detección a nivel de núcleo (por ejemplo, tinción con colorante fluorescente de Hoechst 33258 y con yoduro de propicio) para cuantificar las señales de apoptosis en las células tratadas. Los cambios morfológicos en la cromatina nuclear de las células en proceso de apoptosis fueron detectados mediante tinción con 2,5 µg/mL de fluorocromo bisbencimida Hoechst
25 33258 (Calbiochem, La Jolla, CA) seguido de un examen en un microscopio de fluorescencia. En algunos experimentos, las células fueron teñidas doblemente con yoduro de propicio (PI, 2,5 µg/mL) y Hoechst 33258 (2,5 µg/mL) para distinguir las células apoptóticas de las células necróticas. Los núcleos azules intactos, los núcleos azules condensados/fragmentados, los núcleos rosas condensados/fragmentados y
30 los núcleos rosas intactos fueron considerados células viables, células con apoptosis en fase temprana, células con apoptosis en fase tardía y células necróticas, respectivamente. (Véase, por ejemplo, B.R. Gastman y col. Cancer Res., 60: 6811-6817 (2000); y N. Hail Jr. y R. Lotan, R. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 9: 1293-1301).

En otras realizaciones adicionales, la presente invención usa detección a nivel celular de eventos apoptóticos mediante citometría de flujo. Las células que están sufriendo eventos apoptóticos fueron detectadas mediante citometría de flujo usando un FACSCAN (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) con una línea de láser de 488 nm, y analizadas usando el software Cell Quest (Becton Dickinson). La fosfatidilserina expuesta en el exterior de las células (una de las principales características de la apoptosis) se determina mediante el kit TACSTM Annexin V-FITC (Trevigen, Gaithersburg, MD). La fluorescencia Annexin V-FITC se detecta en FL-1, y el yoduro de propicio se detecta en FL-2. (Hail Jr., y R. Lotan, R. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 9: 1293-1301).

Ejemplo 9

Formación de colonias en agarosa dulce

El ensayo de formación de colonias en agar dulce se usa para medir directamente la capacidad de transformación de las células cancerosas. Se sabe que este ensayo se correlaciona bien con la tumorigenicidad *in vivo*.

Previamente, se ha publicado que cuando Bcl-2 antisentido G3139 sola inhibe la proliferación celular, se contempla que los tratamientos de combinación con fármacos quimioterapéuticos producen mejores efectos. Se llevan a cabo experimentos usando tratamientos de combinación para determinar los efectos apoptóticos o la inhibición de la proliferación celular de inhibidores de Bcl-2 en combinación con agentes quimioterapéuticos conocidos. En las realizaciones preferidas, estos resultados se usan para seleccionar combinaciones sinérgicas de agentes.

Ejemplo 10

Estudios de actividad antitumoral *in vivo*

Los estudios *in vivo* preliminares mostraron que el gosipol es un potente inhibidor de Bcl-XL, y que exhibe una actividad antitumoral significativa por sí solo y en combinación con agentes anticancerígenos convencionales adicionales (por ejemplo, Docetaxel). Las realizaciones preferidas de la presente invención proporcionan extensos estudios *in vivo* de la eficacia y la selectividad antitumorales usando modelos de xenoinjerto de cáncer humano.

Con el fin de diseñar programas óptimos de dosificación para terapias de gosipol, los estudios utilizan primero líneas de células de cáncer de mama humano

MDA-231 (clon 2LMP), y a continuación otros modelos de xenoinjerto de tumor tal como MDA-435 (LCC6) y T47D. El MDA-231 expresa niveles elevados de Bcl-2 y de Bcl-X_L; el MDA-435 expresa niveles elevados de Bcl-2 pero niveles bajos de Bcl-X_L; el T47D expresa niveles bajos de Bcl-2 y niveles elevados de Bcl-X_L. Entre las 7 líneas celulares de cáncer de mama humano examinadas, ninguna línea presentó niveles bajos de Bcl-2 y de Bcl-X_L. El modelo de xenoinjerto en ratones de DU-145 de próstata humana, sin embargo, expresó niveles bajos de Bcl-2 y de Bcl-X_L y por tanto se usa como control negativo en algunas realizaciones para evaluar la especificidad del gosipol y de los derivados de gosipol.

- 10 En el modelo de MDA-231, se lleva a cabo una serie de dosis comprensivas y de investigaciones de programa para determinar: 1) la dosis activa mínima, definida como la inhibición del crecimiento tumoral en un 50% respecto al control, con un nivel de confianza estadístico del 95%; 2) el programa óptimo de administración para la inhibición del crecimiento tumoral sin provocar toxicidad, definida como la pérdida de peso de más del 25%; el efecto del gosipol en tumores grandes (de más de 2.000 mm³); 4) cuánto tiempo puede administrarse el gosipol a ratones del grupo de control sin provocar morbilidad o mortalidad (por ejemplo, pérdida de peso).

- Tras identificar la dosis y el programa de dosificación óptimos, se lleva a cabo la prueba de terapias de combinación con al menos un agente quimioterapéutico convencional adicional, que incluye, aunque sin limitación, 1) Doxorrubicina (4 mg/kg); 2) 5-FU (10 mg/kg); 3) VP-16/Etoposide (40 mg/kg); 4) Ciclofosfamida (100 mg/kg); 5) Cisplatino (10 mg/kg). Como control positivo se usará Taxotere en una dosis de 7,5 mg/kg. Los ratones del grupo de control reciben vehículo solo o ningún tratamiento. Para lograr una significancia estadística se usa un mínimo de 10 ratones por grupo en los regímenes de combinación.

- Para todos los ensayos, se tomaron ratones aleatoriamente y se inyectaron en la palma de la garra con $1-5 \times 10^6$ células preparadas en medio libre de suero. Se midió a los animales y fueron pesados dos veces por semana durante el periodo de tratamiento, seguido de medidas dos veces por semana durante otras 4-6 semanas. Al morir, o en el sacrificio final, se realizará una necropsia visual general de cada animal.

- Se determina la tasa de apoptosis en tejidos usando el método TUNEL (del inglés "terminal deoxyribonucleotidyl transferase [TdT]-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling") para detectar la apoptosis en tejidos y células. Este método es extremadamente sensible y permite la determinación de cantidades muy pequeñas de células apoptóticas *in situ*. (Véase, Y. Gavrieli y col., J. Cell Biol., 119: 493-501; y M.

Dowsett y col., Cytometry, 32: 291-300). Se seccionan tejidos embebidos en parafina, y se incuban láminas en tampón de marcado durante 5 minutos y después en una cámara húmeda con TdT, mezcla dNTP y Mg^{++} en tampón de marcado. Se aplica estreptavidina-peroxidasa de rábano sobre cada muestra durante 10 minutos, se lava y se contra-tiñe con verde de metilo o hematoxilina. La tasa de apoptosis se calcula contando y dividiendo el número de células apoptóticas por el número total de células observadas en el campo de un microscopio óptico con un aumento 40x, y se expresa en tanto por ciento.

10 **Ejemplo 11**

Interacciones de fármaco entre el gosipol y el Docetaxel

El efecto del gosipol solo en el ensayo de respiración de eritromicina (ERMBT), un ensayo fenotípico para el metabolismo de CYP3A4, se evalúa comparando el nivel de línea base de ERMBT y después de 1 semana de pretratamiento con gosipol. (Véase, por ejemplo, P. Watkins, Pharmacogenetics, 4: 171-184; y J. Hirth y col., Clin. Cancer Res., 6: 1255-1258). El ERMBT produce una medida del porcentaje de ^{14}C exhalado por hora, y normalmente se aproxima usando una distribución Normal. (Véase, D. Wagner, Clin. Pharm. Therap., 64: 129-130). Los niveles medios de ^{14}C exhalado/h se compararán usando un ensayo t de parejas, de dos lados, estándar (alfa = 0,05). Usando estimaciones de un trabajo previo (J. Hirth y col., Clin. Cancer Res., 6: 1255-1258 (2000) para la media de la línea base de ^{14}C exhalado/h ($n = 21$, media = 2,41), su desviación estándar (SD = 1,08), la correlación de las medidas ERMBT con el tiempo ($r = 0,81$), y suponiendo una varianza constante en cada medida, el presente estudio a partir de 30 sujetos tiene un 96% de potencia para detectar una disminución en los niveles medios de ERMBT del 20% (de 2,41 a 1,93), y un 81% de potencia para detectar una disminución del 15% (de 2,41 a 2,05). La media, la desviación estándar y el intervalo de valores ERMBT se tabularán y se presentarán, junto con la significancia del ensayo t de parejas.

30 **Ejemplo 12**

Descripción farmacocinética de docetaxel en muestras de pacientes

Se extrae sangre para la descripción farmacocinética de docetaxel cuando se trata en combinación con gosipol usando una estrategia de muestreo óptima. (Véase, P. Baille y col., Clin. Cancer Res., 3: 1535-1538). La sangre se extrae directamente antes del final de la infusión (EOI, del inglés "end of infusión") de docetaxel, a 0,25,

0,75, 3,00, 6,50 y a 24 horas después del EOI. Todas las muestras son evaluadas al mismo tiempo. Se usa un criterio bayesiano para calcular el área bajo la curva (AUC) de concentración en plasma de docetaxel en base a niveles de fármaco medidos y a parámetros farmacocinéticos de población estimados previamente (véase, R. Bruno y col., J. Clin. Oncol., 16: 187-196) para el docetaxel solo, usando el software NONMEM. (S.L. Beal y L.B. Shener, Nonlinear Mixed Effects Model Users Guides (San Francisco, CA, Grupo de Proyecto NONMEM, Universidad de California en San Francisco), 1999). La eliminación (CL, del inglés "Clearance") se estima directamente ajustando el modelo de efectos mixtos no lineal. (R. Bruno y col., J. Clin. Oncol., 16: 187-196). Se calcula el AUC en función de la dosis y de la eliminación, definido como $AUC = \text{dosis}/CL$. Los valores ERMBT de la línea base y después de 1 semana de pretratamiento con gosipol se representan por separado frente a la eliminación. Se usa una regresión de mínimos cuadrados ordinaria para definir la relación entre la CL de Docetaxel y el ERMBT, o el logaritmo natural del ERMBT. Las pendientes estimadas se representan junto a valores previamente publicados para la CL de tratamiento sencillo con docetaxel (J. Hirth y col., Clin. Cancer Res., 6: 1255-1258 (2000)) a fin de describir cualquier diferencia en la CL de docetaxel cuando se administrar en combinación con gosipol frente a la administración sencilla del agente.

20 **Ejemplo 13**

Expresión de proteína de la familia Bcl-2 en muestras de pacientes

Se determina la expresión de Bcl-2 y Bcl-X_L en muestras de tejidos recogidas en bloques de parafina usando métodos de ensayo inmunohistoquímicos (IHC) estándares. Los resultados IHC se dicotomizan y se tabulan para presentar el porcentaje de pacientes que expresan dichos marcadores. Los resultados también se tabulan frente a la respuesta antitumoral. Se lleva a cabo un ensayo exacto de Fisher o un ensayo estadístico de chi-cuadrado para determinar la relación entre la expresión y la respuesta antitumoral, dependiendo del tamaño del conteo celular esperado de la tabla resultante.

30

Ejemplo 14

Estudios de linfocitos sanguíneos periféricos

Se usan muestras sanguíneas tomadas de los participantes del estudio antes del tratamiento del estudio, en el día 8 (después de 1 semana de pretratamiento con gosipol), y en la semana 9 (tras finalizar un ciclo de gosipol más docetaxel) para

35

realizar estudios exploratorios que implican linfocitos sanguíneos periféricos (PBL) y células epiteliales en circulación (CEC). Usando técnicas de clasificación celular activadas por fluorescencia (FACS), se caracterizan los PBLs para determinar su expresión de Bcl-2 y Bcl-X_L antes y después de la administración de gosipol. Se

5 presentará el número medio de PBLs con expresión y su desviación estándar para cada tiempo. Usando un método de separación inmunomagnético descrito previamente (véase, T. Walker y col., Proc. Amer. Soc. Clin. Oncology, 19: 54b) se determina la posibilidad de encontrar CECs para cada paciente. Se presentará el

10 número medio de CECs en 10 mL de sangre extraída y su desviación estándar para todos los pacientes y a cada tiempo.

REIVINDICACIONES

1. El uso de (-)-gospol en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de
cáncer en un sujeto, en el que se administra a dicho sujeto una cantidad
5 terapéuticamente efectiva de dicho (-)-gospol conjuntamente con un agente
anticancerígeno seleccionado del grupo que consiste en docetaxel y paclitaxel.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que
consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, linfoma, cáncer de piel, cáncer
10 pancreático, cáncer de colon, melanoma, cáncer de ovario, cáncer cerebral,
cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón
no-pequeño, carcinoma cervical, leucemia, neuroblastoma, glioblastoma,
carcinoma adrenal y mieloma.
- 15 3. El uso de la reivindicación 2, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que
consiste en cáncer de mama y cáncer de próstata.
4. El uso de la reivindicación 3, en el que dicho cáncer es cáncer de próstata.
- 20 5. El uso de la reivindicación 4, en el que dicho agente anticancerígeno es docetaxel.
6. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es humano.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la administración
25 conjunta de (-)-gospol y docetaxel o paclitaxel produce una actividad
anticancerígena sinérgica en dicho sujeto.
8. (-)-Gospol para su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, en el que
se administra a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho (-)-
30 gospol conjuntamente con un agente anticancerígeno seleccionado del grupo que
consiste en docetaxel y paclitaxel.
9. El (-)-gospol de la reivindicación 8, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo
que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, linfoma, cáncer de piel,
35 cáncer pancreático, cáncer de colon, melanoma, cáncer de ovario, cáncer

cerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón no-pequeño, carcinoma cervical, leucemia, neuroblastoma, glioblastoma, carcinoma adrenal y mieloma.

- 5 10. El (-)-gosipol de la reivindicación 9, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama y cáncer de próstata.
- 11. El (-)-gosipol de la reivindicación 10, en el que dicho cáncer es cáncer de próstata.
- 10 12. El (-)-gosipol de la reivindicación 11, en el que dicho agente anticancerígeno es docetaxel.
- 13. El (-)-gosipol de la reivindicación 8, en el que dicho sujeto es humano.
- 15 14. El (-)-gosipol de una cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en el que la administración conjunta de (-)-gosipol y docetaxel o paclitaxel produce una actividad anticancerígena sinérgica en dicho sujeto.

Figura 1

Bcl-2	5	NREIVMKYIHYKLSQRGYEWDAAGDVGAAPPGAAPAGIFSSQP	
Bcl-xL	5	NRELVVDFLSYKLSQKGYSWSQFSDVEENRTEAPEG---TESE	
Bcl-2	88	VVHLTLRQAGDDFSRRYRRDFAEMSRQLHLTPFTARGRFATVV	130
Bcl-X _L	85	AVKQALREAGDEFELRYRRAFSDLTSQLHITPGTAYQSFEQVV	127
Bcl-2	131	EELFRDGVNWGRIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWM	173
Bcl-XL	128	NELFRDGVNWGRIVAFFSFGGALCVESVDKEMQVLVSRIAAMW	170
Bcl-2	174	TEYLNRLHHTWIQDNGGWDAFVELYG	199
Bcl-X _L	171	ATYLNDRHLEPWIQENGWDTFVELYG	196

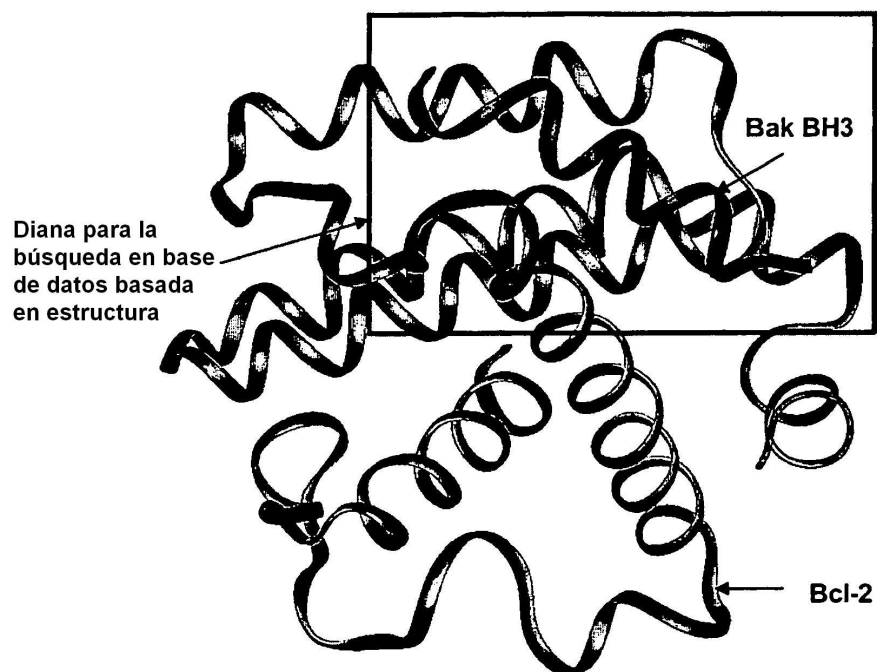
Figura 2

Figura 3

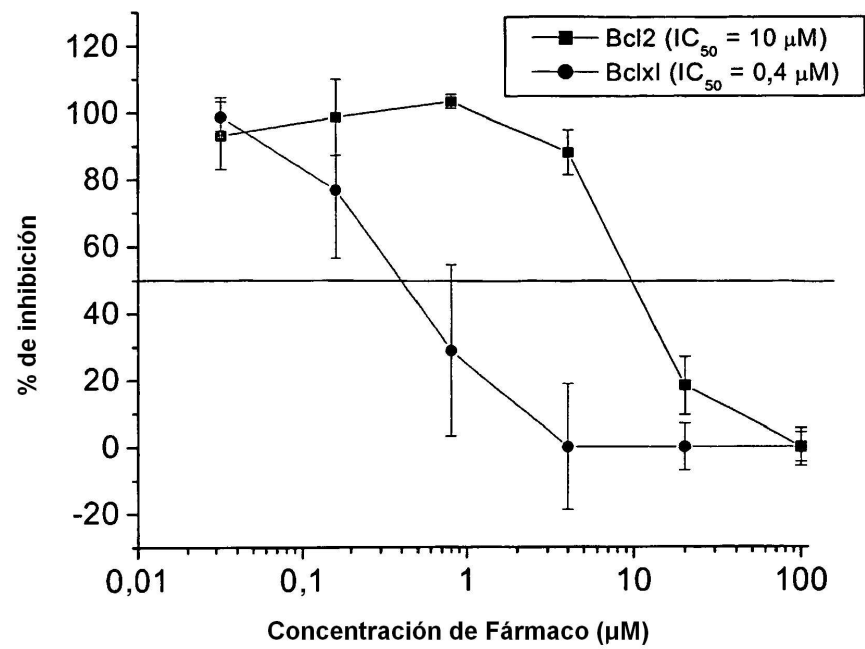
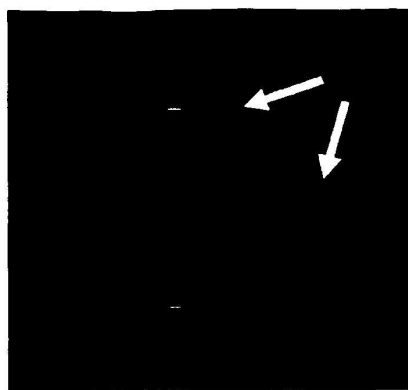
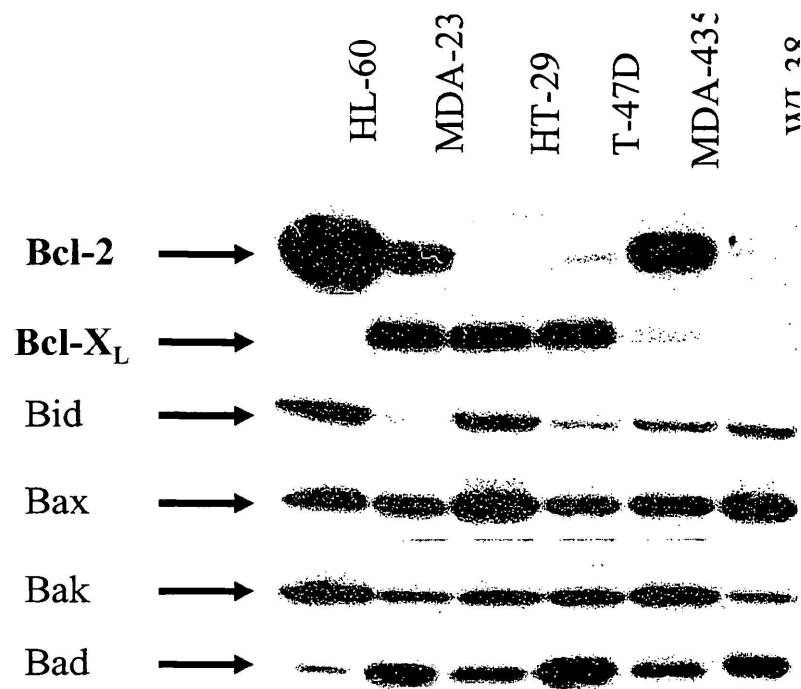
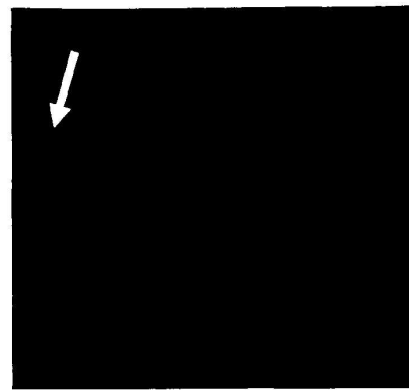


Figura 4



MDA-231

Figura 5A



WI-38

Figura 5B

Figura 6

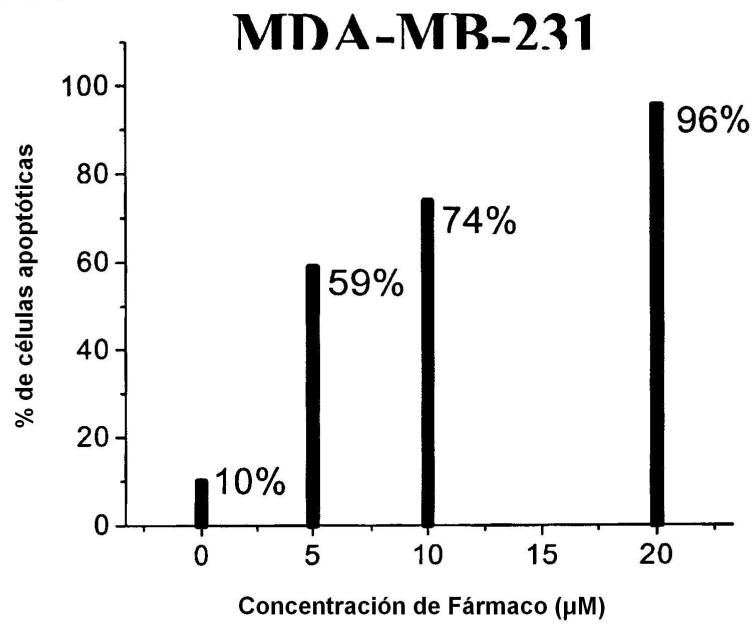


Figura 7

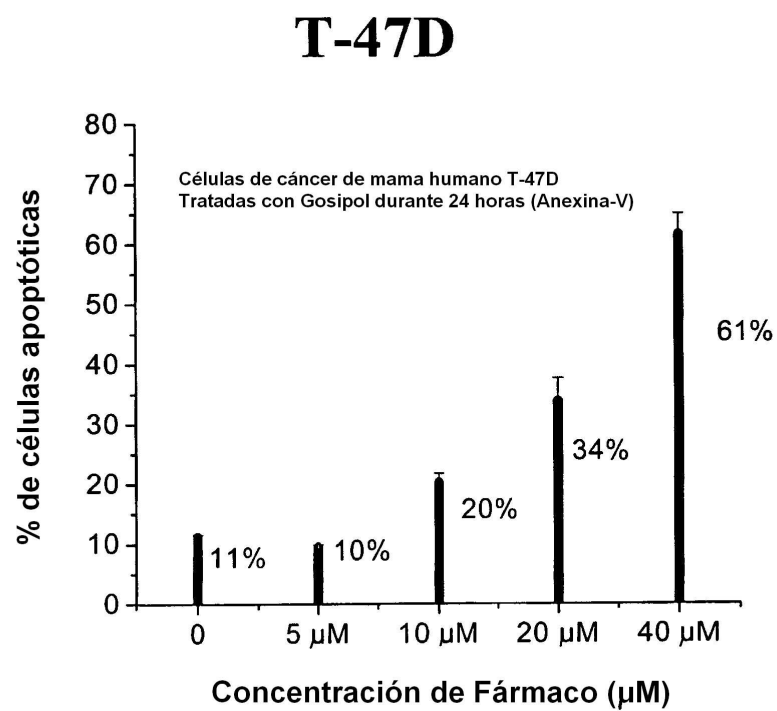


Figura 8A

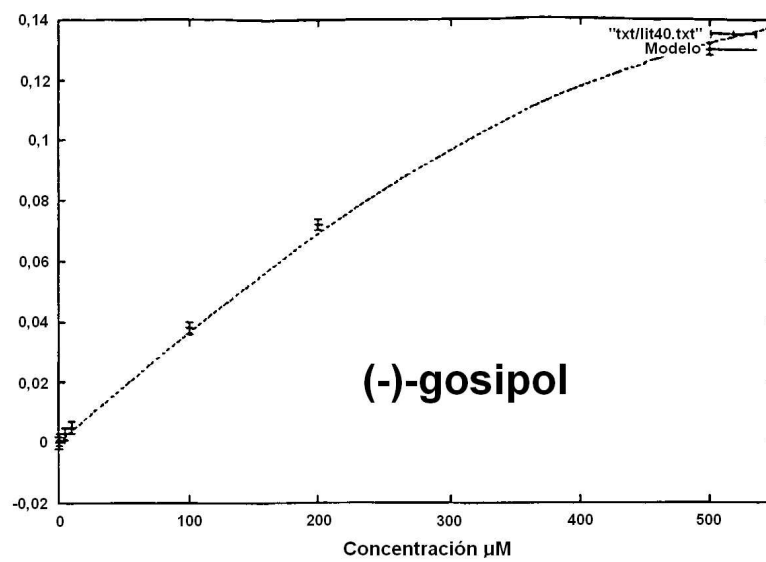


Figura 8B

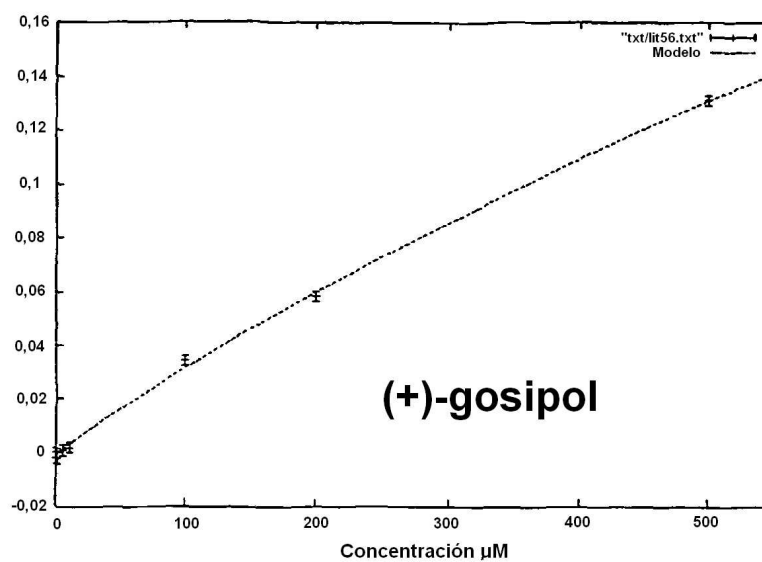


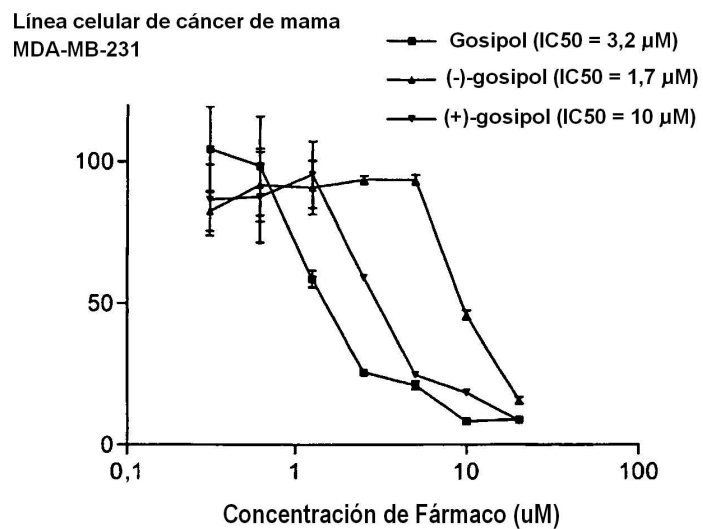
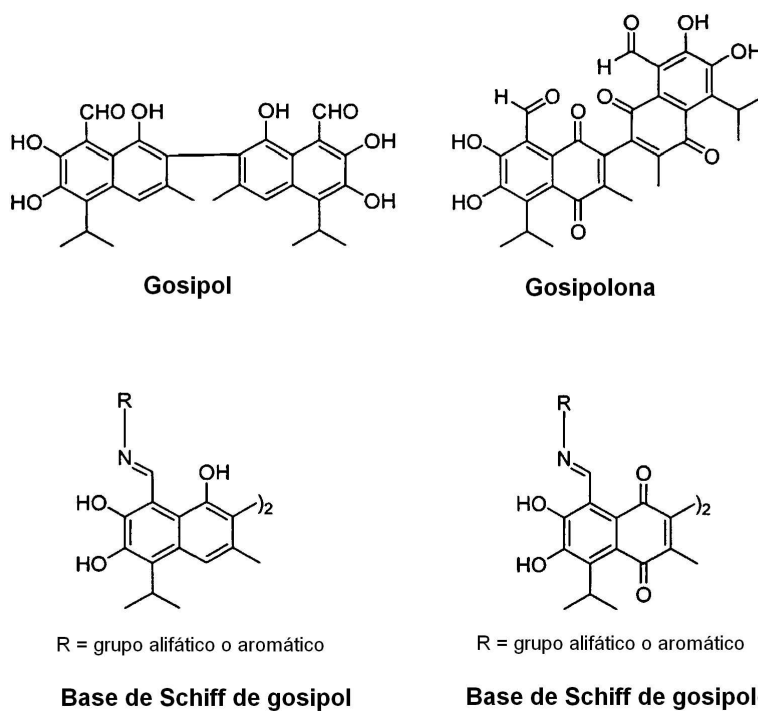
Figura 9**Figura 10**

Figura 11

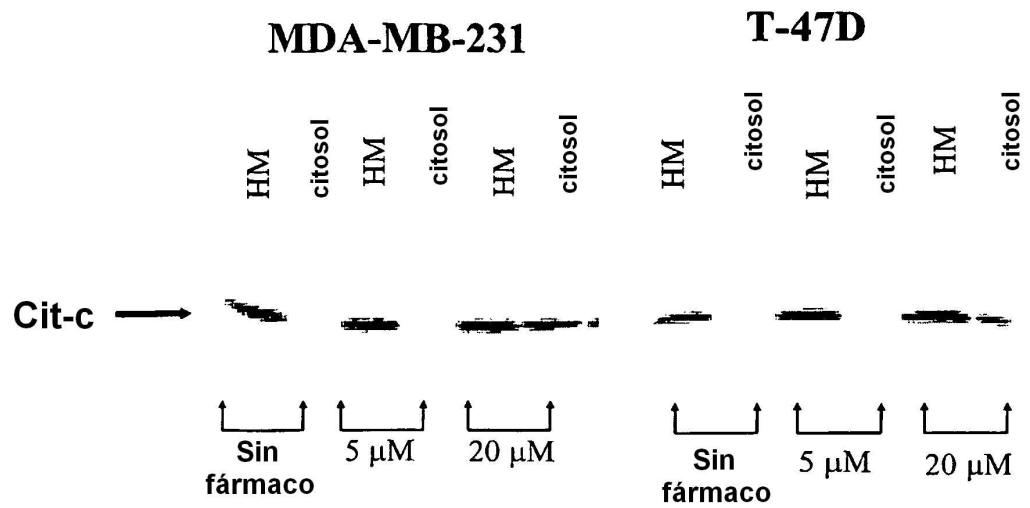


Figura 12

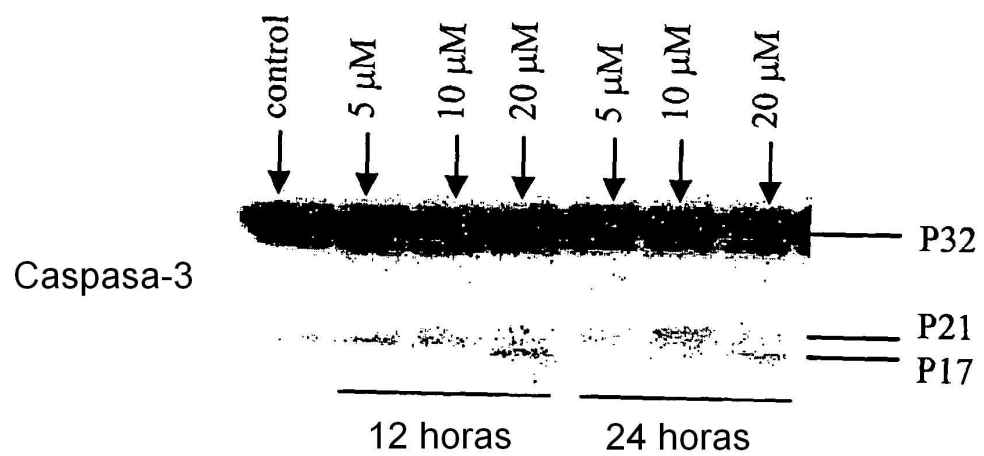


Figura 13

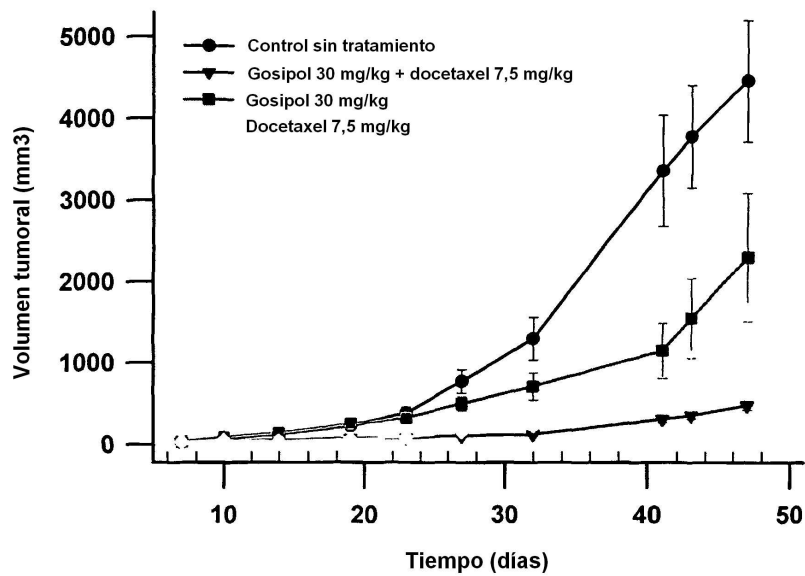
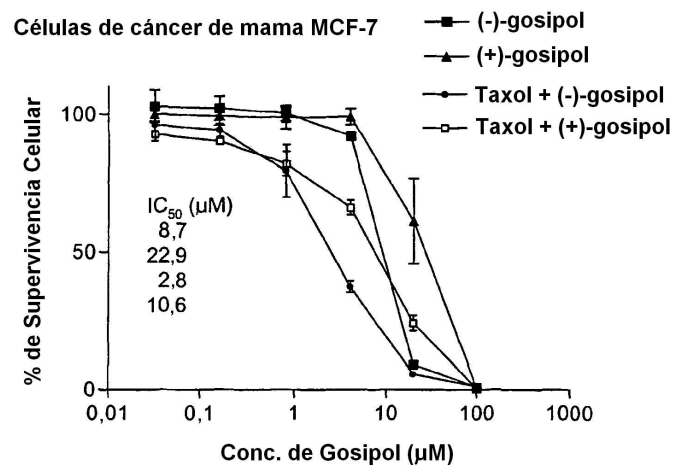


Figura 14



Este experimento usó una relación 100:1 entre (-)-gosipol y Taxol y entre (+)-gosipol y Taxol

Figura 15A

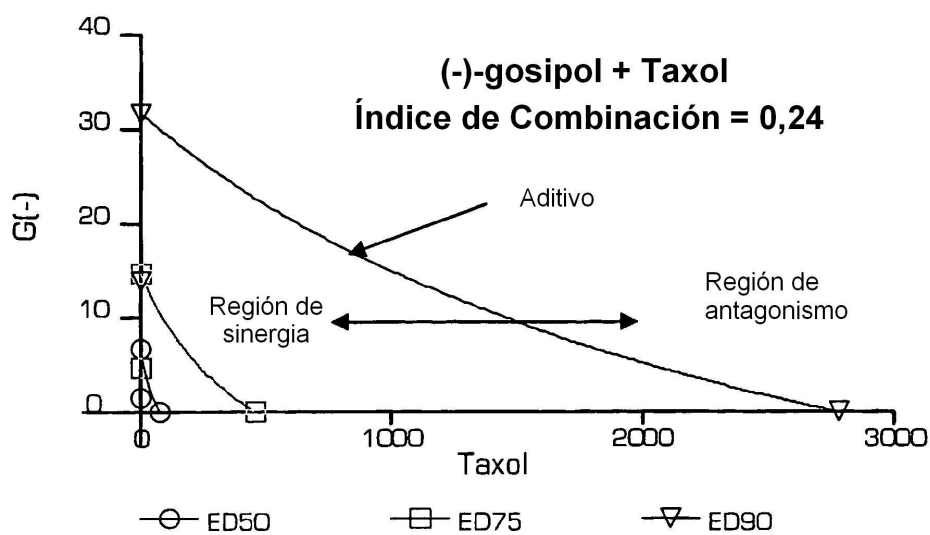


Figura 15B

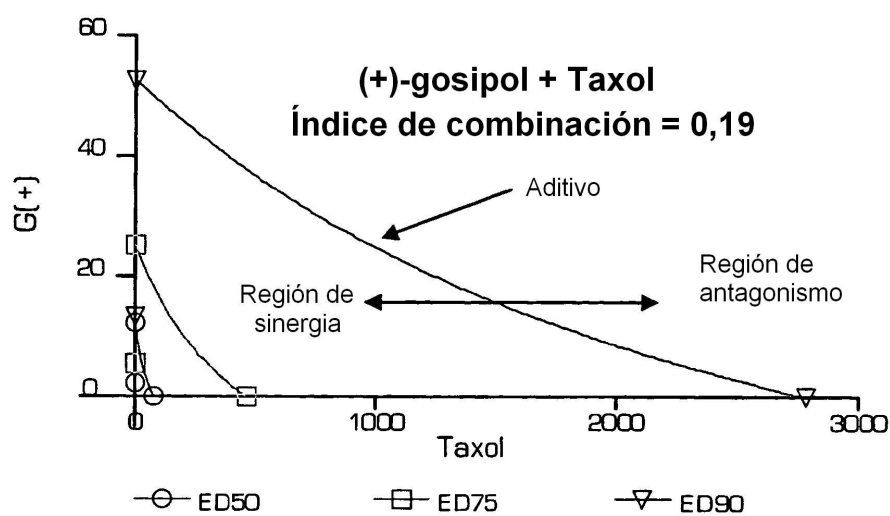
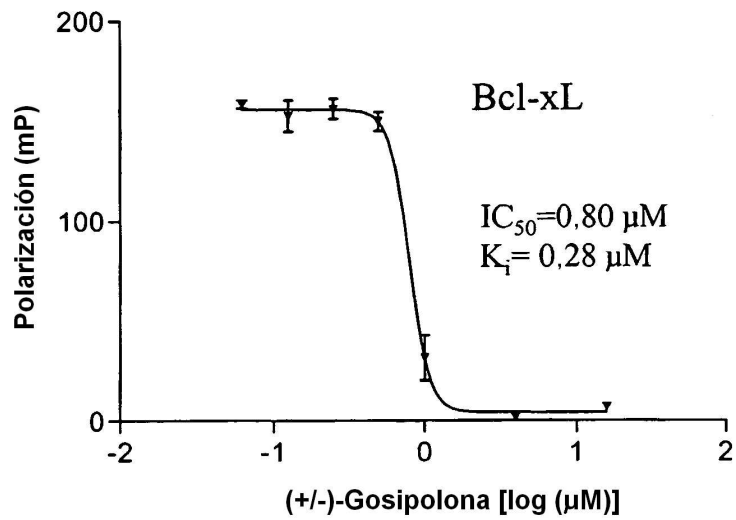


Figura 16

Unión de gossipolona a Bcl-XL

**Figura 17**

Unión de base de Schiff de etilo de (-)-Gossipol

