

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 934**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2012** **E 20152317 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2024** **EP 3679934**

54 Título: **Inducción del gen de TRAIL por moléculas pequeñas en células normales y tumorales como una terapia contra el cáncer**

30 Prioridad:

29.04.2011 US 201161480743 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2024

73 Titular/es:

**THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
304 Old Main
University Park, PA 16802, US**

72 Inventor/es:

**EL-DEIRY, WAFIK, S.;
ALLEN, JOSHUA E. y
WU, GEN, SHENG**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 992 934 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inducción del gen de TRAIL por moléculas pequeñas en células normales y tumorales como una terapia contra el cáncer

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere en general a composiciones para su uso en tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

El ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL; Apo2L) es una proteína endógena que induce selectivamente apoptosis en células cancerosas.

- 10 TRAIL es un potente inductor de apoptosis en una amplia gama de líneas celulares de cáncer humano a través del receptor de muerte 4 (DR4; TRAIL-R1) y el receptor de muerte 5 (DR5; TRAIL-R2) proapoptóticos en la superficie celular a través de la activación de las vías apoptóticas extrínsecas o intrínsecas. TRAIL desempeña un papel directo en la supresión tumoral durante la vigilancia inmune, pero este mecanismo antitumoral se pierde durante la progresión de la enfermedad. La capacidad de TRAIL para iniciar la apoptosis selectivamente en células cancerosas ha llevado a ensayos clínicos en curso con la administración de TRAIL recombinante y los anticuerpos agonistas de TRAIL de mayor duración dirigidos a cualquiera de sus dos receptores de muerte proapoptóticos.

- 15 A pesar de su potencia, el TRAIL recombinante tiene propiedades que limitan su eficacia, tales como una vida media en suero corta, estabilidad, costo y suministro. El suministro de TRAIL recombinante o anticuerpos agonistas de TRAIL al cerebro se limita por la incapacidad del TRAIL recombinante o de los anticuerpos agonistas de TRAIL para cruzar la barrera hematoencefálica.

Allen et al., (2011) Proceedings of the 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; Apr 2-6, 2011; Orlando, FL. Cancer Res; 71(8 Suppl): Abstract 4502. doi:10.1158/1538-7445.AM2011-4502, divulgan que la pequeña molécula TIC10 tiene una potente eficacia anticancerígena mediada por la inducción de la producción de TRAIL en células normales y tumorales.

- 25 Allen et al., (2012) Proceedings of the 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; March 31-Apr 4, 2012; Chicago, IL. Cancer Res. 72(8), Abstract 1935, XP055125782, divulgan que los potentes efectos antitumorales de TIC10 requieren la regulación positiva de los genes Foxo3a y TRAIL.

- 30 Los resultados del índice del almacén de datos DTP para NSC350625, y en particular, las curvas de respuesta a la dosis para NSC350625 del programa de desarrollo de agentes terapéuticos del Instituto Nacional de EE.UU., divulgan resultados *in vitro* para líneas celulares incubadas con NSC350625.

Existe una continua necesidad de composiciones y procedimientos contra el cáncer.

Sumario de la invención

- 35 La presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende el compuesto NSC350625, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento de cáncer del sistema nervioso central, cáncer de pulmón de células no pequeñas o linfoma en un sujeto. En una realización, el método es un tratamiento de un cáncer del sistema nervioso central seleccionado del grupo que consiste en gliomas, meningiomas, adenomas hipofisarios, tumores de la vaina nerviosa y oligodendrogliomas.

- 40 En una realización, el método comprende además administrar un segundo agente terapéutico al sujeto, opcionalmente el segundo agente terapéutico comprende un agente anticanceroso. En una realización, el agente anticanceroso es un inhibidor mitótico. En una realización, el agente anticanceroso es paclitaxel, docetaxel o una combinación de los mismos.

- 45 En una realización, el método comprende además administrar un segundo agente terapéutico al sujeto, en donde el segundo agente terapéutico comprende un agente antiangiogénico. En una realización, el agente antiangiogénico es bevacizumab.

En una realización, la composición se administra por vía oral. En otras realizaciones, la composición se administra por vía rectal, nasal, pulmonar, epidural, ocular, ótica, intraarterial, intracardiaca, intracerebroventricular, intradérmica, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraósea, intratecal, intravesical, subcutánea, tópica, transdérmica, transmucosa, sublingual, bucal, vaginal o por inhalación.

- 50 En una realización, el método comprende además evaluar la eficacia del tratamiento, en donde evaluar la eficacia del tratamiento comprende analizar el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF en una muestra biológica obtenida del sujeto. En una realización, la muestra biológica es sangre, suero, plasma o

líquido cefalorraquídeo.

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 es un gráfico que muestra la actividad del indicador de luciferasa en células HCT116 Bax^{-/-} bajo el control transcripcional de los primeros 504 pares de bases del promotor del gen de TRAIL humano aguas arriba del inicio de la transcripción;
- La Figura 2 es un gráfico que muestra el análisis por RT-qPCR de los niveles de ARNm de TRAIL en células HCT116 p53^{-/-};
- La Figura 3 es un gráfico que muestra los niveles de TRAIL en superficie inducidos por NSC350625 en un panel de células cancerosas;
- La Figura 4 es un gráfico que muestra los niveles de TRAIL en superficie en células HCT116 p53^{-/-} después del tratamiento con NSC350625 en las condiciones y puntos temporales indicados;
- La Figura 5 es un gráfico que muestra los niveles en superficie de TRAIL en HCT116 p53^{-/-} por citometría de flujo a las 72 horas después del inicio del tratamiento con NSC350625;
- La Figura 6 muestra los perfiles del ciclo celular de células HCT116 p53^{-/-} y de fibroblastos de prepucio humano (HFF) tratadas con NSC350625;
- La Figura 7 es un gráfico que muestra la cuantificación de los ensayos de formación de colonias de células cancerosas tratadas con NSC350625;
- La Figura 8 es un gráfico que muestra experimentos paralelos como en la Figura 7 pero con células HFF que se enumeraron en el punto final;
- La Figura 9 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de células HCT116 WT, p53^{-/-} y Bax^{-/-} después del tratamiento con DMSO, NSC350625 o rhTRAIL (25 ng/ml);
- La Figura 10 es una imagen que muestra los resultados del análisis por transferencia de Western;
- La Figura 11 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de células cancerosas tratadas con NSC350625 preincubadas con o sin zVAD-fmk;
- La Figura 12 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de células MDA-MB-231 con inactivación estable de TRAIL por ARN de horquilla corta;
- La Figura 13 es un gráfico que muestra la verificación de la inactivación de TRAILhc en MDA-MB-231 mediante análisis de citometría de flujo de células tratadas con NSC350625;
- La Figura 14 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de la muerte celular inducida por NSC350625 en células H460 con DR5 endógeno o sobreexpresión de un constructo de DR5 con su dominio de muerte reemplazado por EGFP;
- La Figura 15 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de células HCT116 tratadas con DMSO, NSC350625 o rhTRAIL en presencia o ausencia de un anticuerpo secuestrante de TRAIL, RIK-2;
- La Figura 16 es un gráfico que muestra el TRAIL en superficie inducido por NSC350625 con células de cáncer de colon humano recién resacas;
- La Figura 17 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de viabilidad celular de células de cáncer de colon primario de la Figura 16 tratadas con DMSO, NSC350625 o 5-FU;
- La Figura 18 es un gráfico que muestra la capacidad de NSC350625 o rhTRAIL para reducir la viabilidad celular en células HCT116 después de una preincubación de 1 hora a las temperaturas indicadas;
- La Figura 19 es un gráfico que muestra el xenoinjerto de HCT116 p53^{-/-} tratado con NSC350625, TRAIL o vehículo; La Figura 20 es un gráfico que muestra los resultados de la obtención de imágenes bioluminiscentes de xenoinjertos de HCT116 p53^{-/-} infectados con luciferasa tratados con NSC350625 o vehículo;
- La Figura 21 es un gráfico que muestra el xenoinjerto de RKO tratado con NSC350625, TRAIL o vehículo;
- La Figura 22 es un diagrama de caja y bigotes del volumen tumoral el día 9 después del inicio del tratamiento en xenoinjertos de TRAILhc o vector en MDA-MB-231 con NSC350625, TRAIL o vehículo;
- La Figura 23 es un gráfico que muestra el volumen tumoral relativo de xenoinjertos de DLD-1 tratados con TRAIL, NSC350625 o DMSO;

.La Figura 24 es un gráfico que muestra la comparación de la administración oral frente a i.p. de NSC350625 en xenoinjertos de SW480;

La Figura 25 es un gráfico que muestra NSC350625 o vehículo administrados como una dosis oral única en el xenoinjerto de HCT116;

- 5 La Figura 26 es un gráfico que muestra el peso corporal de ratones hembras desnudos atímicos tratados con una dosis única de NSC350625;

La Figura 27 es un gráfico que muestra el peso corporal de ratones hembras C57B6 al final de la semana 4 de tratamiento con NSC350625 oral;

- 10 La Figura 28 es un gráfico que muestra la supervivencia global de Eμ-myc tratado durante las semanas 9-12 con NSC350625 oral semanalmente;

La Figura 29 es un gráfico que muestra la viabilidad celular de células DLD-1 tratadas con NSC350625 en combinación con paclitaxel;

La Figura 30 es un gráfico que muestra la viabilidad celular de células SW620 tratadas con NSC350625 en combinación con paclitaxel;

- 15 La Figura 31 es un gráfico que muestra la viabilidad celular de células DLD-1 tratadas con NSC350625 en combinación con taxotere;

La Figura 32 es un gráfico que muestra la viabilidad celular de células SW620 tratadas con NSC350625 en combinación con taxotere;

- 20 La Figura 33 es un gráfico que muestra el por ciento de cohortes en xenoinjerto de H460 que retienen la carga tumoral después del tratamiento con NSC350625 o taxotere solos, en combinación o con vehículo;

La Figura 34 es un gráfico que muestra un trazado del volumen tumoral relativo para la Figura 33;

La Figura 35 es un gráfico que muestra el por ciento de cohortes en xenoinjerto de H460 que retienen la carga tumoral después del tratamiento con NSC350625 o paclitaxel solos, en combinación o con vehículo;

La Figura 36 es un gráfico que muestra un trazado del volumen tumoral relativo para la Figura 35;

- 25 La Figura 37 es un gráfico que muestra el por ciento de cohortes implantadas con tumores HCT116 p53^{-/-} por vía intracecal con tumores evidentes en los sitios primario y distal en el punto final, tratados con NSC350625, bevacizumab o una combinación de NSC350625 y bevacizumab;

- 30 La Figura 38 es un gráfico que muestra el peso corporal de ratones implantados con tumores HCT116 p53^{-/-} por vía intracecal tratados con vehículo, NSC350625, bevacizumab o una combinación de NSC350625 y bevacizumab;

La Figura 39 es un gráfico que muestra los niveles séricos de TRAIL en ratones libres de tumor después de NSC350625 o doxorubicina;

La Figura 40 es un gráfico que muestra el perfil de absorbancia de NSC350625 con un pico de absorbancia a 239 nm;

- 35 La Figura 41 es un gráfico que muestra una curva de calibración para NSC350625 añadida al plasma de ratón y cuantificada por análisis de HPLC mediante el uso del área bajo la curva (AUC);

.La Figura 42 es un gráfico que muestra las concentraciones plasmáticas de NSC350625 después de la administración intravenosa en ratones hembras C57B6;

- 40 La Figura 43 es un gráfico que muestra el análisis de TRAIL en superficie de células HFF después del tratamiento con NSC350625, 0, 2,5, 5 o 10 μM de izquierda a derecha;

La Figura 44 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de un cocultivo de células HCT116 p53^{-/-} y HFF pretratadas;

La Figura 45 es un gráfico que muestra el TRAIL en superficie en líneas celulares GBM después de la incubación con NSC350625;

- 45 La Figura 46 es un gráfico que muestra los valores de GI50 extrapolados de los ensayos de viabilidad celular de las líneas celulares GBM indicadas a las 72 horas después del tratamiento con NSC350625 o DMSO;

La Figura 47 muestra los resultados de un ensayo de viabilidad celular de tejido de glioblastoma humano recién

resecoado tratado con DMSO, NSC350625 o temozolomida;

La Figura 48 es un gráfico que muestra el xenoinjerto subcutáneo de T98G con ratones que reciben una dosis única de vehículo, NSC350625 o bevacizumab;

5 La Figura 49 es un gráfico que muestra la supervivencia general de ratones que albergan tumores intracraneales SF767 tratados con una dosis oral única de vehículo, NSC350625, bevacizumab o NSC350625 y bevacizumab;

La Figura 50 es un gráfico que muestra los cambios transcripcionales asociados con la señalización FOXO a partir del perfil de expresión génica de células HCT116 p53^{-/-} a las 48 horas después del tratamiento con NSC350625 frente a DMSO;

10 La Figura 51 es una imagen del análisis por transferencia de Western de DR5 en células HCT116 tratadas con NSC350625 o DMSO;

.La Figura 52 es un gráfico que muestra el análisis por citometría de flujo de los niveles de DR5 en superficie en células cancerosas y normales tratadas con NSC350625;

15 La Figura 53 es una imagen del análisis por transferencia de Western de lisados de células enteras (W) y extractos citoplasmáticos (C) y nucleares (N) de células HCT116 tratadas con DMSO o NSC350625;

La Figura 54 es una imagen de los resultados de un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina para la translocación inducida por NSC350625 de Foxo3a al promotor TRAIL a las 48 horas después del tratamiento con NSC350625 en células HCT116 p53^{-/-}; 0, 2,5, 5 o 10 µM de izquierda a derecha;

20 La Figura 55 es un gráfico que muestra los resultados del análisis por citometría de flujo de los niveles de TRAIL en superficie celular inducidos por NSC350625 con o sin inactivación transitoria de Foxo1 y/o Foxo3a en células HCT116 p53^{-/-} mediante el uso de ARNip;

La Figura 56 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de la muerte celular inducida por NSC350625 con o sin inactivación estable de Foxo3a en células HCT116;

25 La Figura 57 es un gráfico que muestra el análisis por citometría de flujo de TRAIL en superficie inducido por NSC350625 con o sin inactivación estable de Foxo3a en células HCT116;

La Figura 58 es un gráfico que muestra el volumen tumoral del xenoinjerto de HCT116 con o sin inactivación estable de Foxo3a después de una dosis oral única de vehículo o NSC350625;

La Figura 59 es una imagen del análisis por transferencia de Western de células HCT116 p53^{-/-} tratadas con NSC350625, 2,5, 5, 10 µM durante 72 h;

30 La Figura 60 es una imagen del análisis por transferencia de Western de células HCT116 p53^{-/-} tratadas con NSC350625;

La Figura 61 es un gráfico que muestra el curso temporal de los niveles de expresión de proteínas de los efectos inducidos por NSC350625 determinados por densitometría de transferencias de Western de experimentos replicados como en la Figura 60;

35 La Figura 62 es una imagen del análisis por transferencia de Western de los efectos inducidos por NSC350625 sobre Foxo3a en células de cáncer de colon humano DLD1, células de cáncer de mama humano MDA-MB-468 y líneas celulares de glioblastoma multiforme humano T98G;

La Figura 63 es una imagen del análisis por transferencia de Western que muestra la sobreexpresión de myr-Akt;

40 La Figura 64 es un gráfico que muestra el análisis por citometría de flujo de TRAIL en superficie en células HCT116 que sobreexpresan un vector vacío o Akt miristilado (myr-Akt) con tratamiento con NSC350625;

La Figura 65 es un gráfico que muestra el contenido por sub-G1 de células HCT116 que sobreexpresan un vector vacío o myr-Akt con tratamiento con NSC350625;

45 La Figura 66 es un gráfico que muestra el análisis por RT-qPCR de ARNm de TRAIL en células HCT116 p53^{-/-} después de la incubación con A6730 (inh de Akt), monoetanolato de U0126 (inh de MEK), o ambos;

La Figura 67 es un gráfico que muestra la inducción de TRAIL en superficie como en la Figura 66 con o sin inactivación estable de Foxo3a;

La Figura 68 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de MDA-MB-231 con o sin inactivación de TRAIL por ARNhc después de la incubación con inh de Akt, inh de MEK o ambos;

La Figura 69 es un gráfico que muestra el análisis de TRAIL en superficie de células HCT116 p53^{-/-} después de la incubación con A6730 (inh de Akt), monoetanolato de U0126 (inh de MEK), o ambos;

La Figura 70 es un gráfico que muestra el análisis por RT-qPCR de los niveles de ARNm de TRAIL después de la inactivación transitoria de Akt y/o ERK en células HCT116 p53^{-/-};

- 5 La Figura 71 es una imagen que muestra la confirmación de la inactivación de Akt y ERK por análisis de transferencia de Western; y

La Figura 72 es un gráfico que muestra el análisis de TRAIL en superficie después de la inactivación transitoria de Akt y/o ERK en células HCT116.

Descripción detallada de la invención

- 10 Los términos científicos y técnicos usados en la presente memoria se pretende que tengan los significados que se entienden comúnmente por los expertos en la técnica. Dichos términos se encuentran definidos y usados en contexto en diversas referencias estándar lo que incluye ilustrativamente J. Sambrook y D.W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ra ed., 2001; F.M. Ausubel, Ed., Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols; 5ta ed., 2002; B. Alberts y otros, Molecular Biology of the Cell, 4ta Ed., Garland, 2002; D.L. Nelson y M.M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, 4ta Ed., W.H. Freeman & Company, 2004; Engelke, D.R., RNA Interference (RNAi): Nuts and Bolts of RNAi Technology, DNA Press LLC, Eagleville, PA, 2003; Herdewijn, P. (Ed.), Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2004; A. Nagy, M. Gertsenstein, K. Vintersten, R. Behringer, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 3ra edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 15 de diciembre, 2002, ISBN-10: 0879695919; Kursad Turksen (Ed.), Embryonic stem cells: methods and protocols in Methods Mol Biol. 2002; 185, Humana Press; Current Protocols in Stem Cell Biology, ISBN: 9780470151808.

Los términos singulares "un", "uno, una" y "el/la" no pretenden ser limitantes e incluyen los referentes plurales a menos que se indique explícitamente o el contexto indique claramente lo contrario.

- 25 Las composiciones de acuerdo con los aspectos de la presente invención se refieren al compuesto 10 inductor de TRAIL (NSC350625), identificado por los presentes inventores como una molécula pequeña inductora transcripcional del gen de TRAIL mediante un tamiz para compuestos inductores de TRAIL que regulan positivamente el gen de TRAIL por un mecanismo que no depende de p53, ya que p53 se inactiva con frecuencia en los cánceres en etapa tardía, lo que provoca resistencia a muchas terapias del estándar de atención tales como 5-FU y doxorrubicina.

- 30 NSC350625 induce la expresión de TRAIL en células normales y cancerosas. Los términos "induce la expresión de TRAIL", "TRAIL inducido por NSC350625" y equivalentes gramaticales de los mismos, usados en la presente memoria para describir un efecto de NSC350625 o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, se refieren a la producción de un aumento detectable de TRAIL por células puestas en contacto con NSC350625 o un sal aceptable farmacéuticamente del mismo. Puede determinarse un aumento detectable de TRAIL mediante ensayos para la proteína TRAIL o los ácidos nucleicos de TRAIL mediante el uso de una metodología de ensayo para proteínas o ácidos nucleicos bien conocida.

- 40 El TRAIL inducido por NSC350625 se mantiene en las células cancerosas, así como también en las células normales y el suero, lo que permite un efecto inespecífico mediado por TRAIL en las células cancerosas y los tumores. NSC350625 inactiva Akt y ERK, lo que conduce a la translocación nuclear de Foxo3a y a la inducción de la transcripción de TRAIL.

El TRAIL inducido por NSC350625 depende de Foxo3a, que también regula positivamente el receptor de muerte DR5 de TRAIL entre otros objetivos, lo que permite la sensibilización de algunas células tumorales resistentes a TRAIL. La inducción de TRAIL provocada por NSC350625 se sostiene en las células tumorales, del estroma y del huésped.

- 45 La presente invención proporciona así una composición farmacéutica que comprende el compuesto NSC350625, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento de cáncer del SNC, cáncer de pulmón de células no pequeñas o linfoma en un sujeto.

- 50 El compuesto NSC350625 puede obtenerse comercialmente o sintetizarse mediante el uso de metodología de síntesis química estándar.

Las sales aceptables farmacéuticamente de NSC350625 pueden obtenerse comercialmente o sintetizarse mediante el uso de una metodología de síntesis química estándar.

Una sal "aceptable farmacéuticamente" es adecuada para su uso en un sujeto sin toxicidad o irritación indebida para el sujeto y es eficaz para el uso previsto.

Las sales aceptables farmacéuticamente incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base aceptables farmacéuticamente. Las sales aceptables farmacéuticamente se conocen bien en la técnica, tales como las detalladas en S. M. Berge y otros, *J. Pharm. Sci.*, 66:1-19, 1977. Las sales aceptables farmacéuticamente ejemplares son aquellas adecuadas para su uso en un sujeto sin toxicidad o irritación indebida para el sujeto y que son eficaces para su uso previsto que se forman con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido sulfámico; ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido adípico, ácido alginico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido butírico, ácido canfórico, ácido canforsulfónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido diglucónico, ácido etanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glutámico, ácido glicólico, ácido glicerofosfórico, ácido hemisulfico, ácido heptanoico, ácido hexanoico, ácido 2-hidroxietanosulfónico (ácido isetiónico), ácido láctico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido mesitilenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido nicotínico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido oxálico, ácido pámico, ácido pectínico, ácido fenilacético, ácido 3-fenilpropiónico, ácido pícrico, ácido piválico, ácido propiónico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfanílico, ácido tartárico, ácido p-toluenosulfónico, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético y ácido undecanoico; bases inorgánicas tales como amoniaco, hidróxido, carbonato y bicarbonato de amonio; bases orgánicas tales como compuestos de amina primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, amonio, arginina, betaína, colina, cafeína, diolamina, dietilamina, dietanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitclohexilamina, dibencilamina, N,N-dibencilfenetilamina, 1-efenamina, N,N'-dibenciletilendiamina, etanolamina, etilamina, etilendiamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, 1h-imidazol, lisina, metilamina, N-etilpiperidina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, N,N-dimetilanilina, piperazina, trolamina, metilglucamina, purinas, piperidina, piridina, teobromina, compuestos de tetrametilamonio, compuestos de tetraetilamonio, trimetilamina, trietilamina, tripropilamina y tributilamina y cationes metálicos tales como aluminio, calcio, cobre, hierro, litio, magnesio, manganeso, potasio, sodio y zinc.

Composiciones farmacéuticas para uso en la invención pueden incluir NSC350625 o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo como un primer agente terapéutico; un vehículo aceptable farmacéuticamente; y un segundo agente terapéutico, tal como un agente contra el cáncer.

La proteína TRAIL puede analizarse en una muestra de prueba obtenida de un sujeto para detectar la expresión de TRAIL inducida por NSC350625.

Pueden usarse procedimientos de inmunoensayo para analizar TRAIL en una muestra, lo que incluye, análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo de inmunofiltración ligado a enzimas (ELIFA), citometría de flujo, inmunotransferencia, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, inmunoensayo luminiscente (LIA), inmunoensayo fluorescente (FIA) y radioinmunoensayo. Los procedimientos de ensayo pueden usarse para obtener resultados cualitativos y/o cuantitativos. Los detalles específicos de los procedimientos de ensayo adecuados para el ensayo cualitativo y cuantitativo de una muestra se describen en referencias estándar, lo que incluye ilustrativamente E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; F. Breitling y S. Dübel, *Recombinant Antibodies*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1999; H. Zola, *Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives, Basics: From Background to Bench*, BIOS Scientific Publishers, 2000; B.K.C. Lo, *Antibody Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 2003; F. M. Ausubel y otros, Eds., *Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols*, Wiley, 2002; S. Klussman, Ed., *The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications*, Wiley, 2006; Ormerod, M. G., *Flow Cytometry: a practical approach*, Oxford University Press, 2000; Givan, A. L., *Flow Cytometry: first principles*, Wiley, Nueva York, 2001; Gorczyca, W., *Flow Cytometry in Neoplastic Hematology: morphologic-immunophenotypic correlation*, Taylor & Francis, 2006; Crowther, J. R., *The ELISA Guidebook (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press, 2000; Wild, D., *The Immunoassay Handbook*, 3ra Edición, Elsevier Science, 2005 y J. Sambrook y D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ra Ed., 2001.

Los aptámeros pueden usarse para analizar una muestra para TRAIL. El término "aptámero" se refiere a un péptido y/o ácido nucleico que se une sustancialmente específicamente a una sustancia especificada. En el caso de un aptámero de ácido nucleico, el aptámero se caracteriza por la interacción de unión con un objetivo distinto del emparejamiento de bases de Watson/Crick o la unión de triple hélice con un segundo y/o tercer ácido nucleico. Dicha interacción de unión puede incluir interacción de Van der Waals, interacción hidrófoba, enlaces de hidrógeno y/o interacciones electrostáticas, por ejemplo. De manera similar, los aptámeros basados en péptidos se caracterizan por la unión específica a un objetivo en el que el aptámero no es un ligando de origen natural para el objetivo. Las técnicas para la identificación y generación de péptidos y aptámeros de ácido nucleico y su uso se conocen en la técnica tal como se describe, por ejemplo, en F. M. Ausubel y otros, Eds., *Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols*, Wiley, 2002; S. Klussman, Ed., *The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications*, Wiley, 2006; y J. Sambrook y D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ra Ed., 2001.

El análisis espectrométrico se usa para analizar una muestra para TRAIL. Por ejemplo, puede usarse el análisis

de masas en un ensayo de acuerdo con aspectos de la presente invención. El análisis de masas se lleva a cabo mediante el uso de, por ejemplo, espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF) o espectrometría de masas de resonancia de ciclotrón por transformada de Fourier. Las técnicas de espectrometría de masas se conocen en la técnica y se encuentran descripciones detalladas ejemplares de procedimientos para el ensayo de proteínas y/o péptidos en Li J., y otros, Clin Chem., 48(8):1296-304, 2002; Hortin, G.L., Clinical Chemistry 52: 1223-1237, 2006; Hortin, G.L., Clinical Chemistry 52: 1223-1237, 2006; A.L. Burlingame, y otros (Eds.), Mass Spectrometry in Biology and Medicine, Humana Press, 2000; y D.M. Desiderio, Mass Spectrometry of Peptides, CRC Press, 1990.

La localización de TRAIL en la superficie de las células puede analizarse para detectar un efecto de una composición farmacéutica de la presente invención. La detección de la localización de TRAIL puede realizarse por inmunoensayo, tal como citometría de flujo, así como también por inmunohistoquímica.

Una muestra de prueba puede ser cualquier fluido biológico, célula o tejido de un sujeto, lo que incluye ilustrativamente sangre, plasma, suero, orina, saliva, ascitis, líquido cefalorraquídeo, líquido cerebroventricular, líquido pleural, muestras de lavado pulmonar y bronquial, mucosa, sudor, lágrimas, semen, muestras de lavado de vejiga, líquido amniótico, linfa, líquido peritoneal, líquido sinovial, aspirado de médula ósea, células o tejidos tumorales, células o tejidos orgánicos, tales como material de biopsia. En aspectos preferentes, una muestra de prueba es sangre, plasma o suero.

Una muestra de prueba de un sujeto se purifica opcionalmente para TRAIL u otro ensayo de biomarcador. El término "purificada" en el contexto de una muestra de prueba se refiere a la separación de TRAIL u otro biomarcador de al menos otro componente presente en la muestra de prueba. La purificación de la muestra de prueba se logra mediante técnicas ilustrativas lo que incluye procedimientos electroforéticos tales como electroforesis en gel y electroforesis en gel en 2-D; procedimientos de cromatografía tales como HPLC, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de capa fina y de papel.

El análisis de TRAIL puede realizarse en células y tejidos. Por ejemplo, los procedimientos inmunohistoquímicos y la hibridación in situ pueden usarse para analizar la proteína y/o el ácido nucleico de TRAIL en una muestra de prueba de células o tejidos.

Pueden usarse uno o más estándares para permitir la determinación cuantitativa de TRAIL en una muestra.

El análisis de TRAIL en una muestra de prueba puede compararse con el análisis de TRAIL en una muestra control. Las muestras control pueden obtenerse de uno o más sujetos normales, por ejemplo.

De acuerdo con aspectos de la presente invención, los análisis para TRAIL se usan para monitorear un sujeto. De esta forma, por ejemplo, se obtiene una muestra de prueba del sujeto antes del tratamiento con una composición farmacéutica de la presente invención y una o más veces durante y/o después del tratamiento para evaluar la eficacia del tratamiento. En un ejemplo adicional, se obtiene una muestra de prueba del sujeto en diversos momentos para evaluar el curso o el progreso de la enfermedad o la curación.

En aspectos particulares, se analizan uno o más biomarcadores adicionales en una muestra de prueba obtenida de un sujeto para ayudar a monitorear el tratamiento con una composición farmacéutica de la presente invención. Por ejemplo, uno o más de localización y/o fosforilación de fosfo-ERK, fosfo-Akt, Foxo3a se analiza en una muestra de prueba obtenida de un sujeto para ayudar a monitorear el tratamiento con una composición farmacéutica de la presente invención. Dichos biomarcadores adicionales se analizan mediante procedimientos de inmunoensayo como los descritos en la presente memoria.

El ácido nucleico de TRAIL se puede analizar en una muestra de prueba obtenida de un sujeto para detectar la expresión de TRAIL inducida por NSC350625. Los ensayos para detectar ácidos nucleicos de TRAIL, particularmente ARNm o ADNc, incluyen, reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) tales como RT-PCR, transferencia de mancha, hibridación in situ, transferencia de Northern y protección de ARNasa.

Se describe en este documento que el tratamiento de un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, cáncer, mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de NSC350625 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un vehículo farmacéuticamente aceptable; es eficaz para inducir la expresión de TRAIL en el sujeto.

El cáncer del CNS, cáncer de pulmón de células no pequeñas o linfoma tratados usando composiciones descritos en la presente memoria se caracterizan por una proliferación celular anormal lo que incluye, pero no está limitada a, hiperproliferación preneoplásica, cáncer in situ, neoplasias y metástasis. Las composiciones de la presente invención pueden usarse para la profilaxis, así como también para la mejora de los signos y/o síntomas del cáncer. Los términos "tratar" y "tratamiento" usados para referirse al tratamiento de un cáncer en un sujeto incluyen: prevenir, inhibir o mejorar el cáncer en el sujeto, tal como ralentizar la progresión del cáncer y/o reducir o mejorar un signo o síntoma del cáncer.

Una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición para su uso en la presente invención es una cantidad que tiene un efecto beneficioso en un sujeto que está siendo tratado. En sujetos que padecen cáncer del sistema nervioso central, cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de linfoma, una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición de la presente invención es eficaz para mejorar o prevenir uno o más signos y/o síntomas de la afección, o es eficaz para aumentar de forma detectable la apoptosis y/o disminuir la proliferación de células de cáncer del sistema nervioso central, cáncer de pulmón de células no pequeñas o linfoma.

NSC350625 posee una actividad de amplio espectro descrita en la presente memoria en muestras primarias de pacientes y líneas celulares que son resistentes a las terapias convencionales, lo que indica que la acción terapéutica de NSC350625 no depende exclusivamente de moléculas comúnmente alteradas en el cáncer tales como EGFR, Her2, KRAS o PTEN. La elucidación del mecanismo celular terapéutico de NSC350625 permite la identificación de mecanismos de resistencia tales como sobreactivación de Akt, descrito en la presente memoria, y proporciona la localización y fosforilación de fosfo-ERK, fosfo-Akt, Foxo3a, y TRAIL en superficie y suero como biomarcadores correlativos de la actividad terapéutica de NSC350625 en el cáncer.

Por lo tanto, de acuerdo con los aspectos de la presente invención, se analizan uno o más biomarcadores correlativos de la actividad terapéutica de NSC350625 en el cáncer puede ser ensayado para evaluar el tratamiento con la composición farmacéutica de la presente invención.

Un sujeto tratado usando composiciones de la presente invención puede ser mamífero o no mamífero. Un sujeto mamífero puede ser cualquier mamífero, lo que incluye un ser humano; un primate no humano; un roedor tal como un ratón, rata o cobaya; una mascota domesticada tal como un gato o un perro; un caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra o conejo. Un sujeto no mamífero puede ser cualquier no mamífero, lo que incluye un pato, un ganso, un pollo o un pavo. Los sujetos pueden ser de ambos géneros y de cualquier edad. En aspectos de la invención, el sujeto es humano. Los términos "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente en la presente memoria.

Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la invención generalmente incluye aproximadamente el 0,1-99 % de NSC350625, una sal aceptable farmacéuticamente del mismo; y un vehículo aceptable farmacéuticamente. Las combinaciones de NSC350625 y al menos una sal aceptable farmacéuticamente del mismo en una composición farmacéutica también se consideran dentro del ámbito de la presente invención.

Las combinaciones de agentes terapéuticos se pueden administrar de acuerdo con aspectos de la presente invención. De acuerdo con aspectos de la presente invención, tratamiento del cáncer de CNS, cáncer de pulmón de células no pequeñas o linfoma en un sujeto puede incluir la administración de una composición farmacéutica de NSC350625, una sal aceptable farmacéuticamente del mismo; y al menos un agente terapéutico adicional. De acuerdo con aspectos de la presente invención, el tratamiento puede incluir la administración de una composición farmacéutica de NSC350625, una sal aceptable farmacéuticamente del mismo; y al menos dos agentes terapéuticos adicionales.

El término "agente terapéutico adicional" se usa en la presente memoria para referirse a un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica (tal como un ácido nucleico, un anticuerpo, una proteína o una porción de los mismos, por ejemplo, un péptido), o un extracto hecho de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos animales (particularmente mamíferos) que es una sustancia (o sustancias) biológica, fisiológica o farmacológicamente activa que actúa local o sistémicamente en un sujeto.

Los agentes terapéuticos adicionales pueden incluir antibióticos, antivirales, agentes antineoplásicos, analgésicos, antipiréticos, antidepresivos, antipsicóticos, agentes contra el cáncer, antihistamínicos, agentes antiosteoporosis, agentes antiosteonecrosis, agentes antiinflamatorios, ansiolíticos, agentes quimioterapéuticos, diuréticos, factores de crecimiento, hormonas, agentes antiinflamatorios no esteroideos, esteroides y agentes vasoactivos.

Las terapias combinadas que usan NSC350625, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo y uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden mostrar efectos sinérgicos, por ejemplo, un mayor efecto terapéutico que el que se observaría con una composición farmacéutica de la presente invención que incluye NSC350625, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, o uno o más agentes terapéuticos adicionales solos como una monoterapia.

De acuerdo con aspectos, las terapias combinadas incluyen: (1) composiciones farmacéuticas que incluyen una composición farmacéutica que incluye NSC350625, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo formuladas juntas en una composición única con uno o más agentes terapéuticos adicionales; y (2) coadministración de una composición farmacéutica que incluye NSC350625, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo con uno o más agentes terapéuticos adicionales en la que la composición farmacéutica que incluye NSC350625, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo y uno o más agentes terapéuticos adicionales no se han formulado en la misma composición. Cuando se usan formulaciones

separadas, la composición farmacéutica que incluye NSC350625, o sal aceptable farmacéuticamente del mismo pueden administrarse al mismo tiempo, tiempos intermitentes, tiempos escalonados, antes, después o combinaciones de los mismos, con referencia a la administración del uno o más agentes terapéuticos adicionales.

- 5 Los tratamientos combinados pueden permitir una dosis eficaz reducida y un índice terapéutico aumentado de la composición farmacéutica que incluye NSC350625, una sal aceptable farmacéuticamente del mismo de la presente invención y el uno o más agentes terapéuticos adicionales usados en los procedimientos de la presente invención.

- 10 De acuerdo con aspectos, las terapias combinadas incluyen: (1) composiciones farmacéuticas que incluyen una composición farmacéutica que incluye NSC350625, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo formuladas juntas en una composición única con uno o más agentes contra el cáncer adicionales; y (2) la administración conjunta de una composición farmacéutica que incluye NSC350625, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo con uno o más agentes contra el cáncer adicionales en la que la composición farmacéutica que incluye NSC350625, o sal aceptable farmacéuticamente del mismo y uno o más agentes
15 terapéuticos adicionales no se han formulado en la misma composición. Cuando se usan formulaciones separadas, la composición farmacéutica que incluye NSC350625, o sal aceptable farmacéuticamente del mismo puede administrarse al mismo tiempo, tiempos intermitentes, tiempos escalonados, antes, después o combinaciones de los mismos, con referencia a la administración del uno o más agentes contra el cáncer adicionales.

- 20 Los agentes contra el cáncer se describen, por ejemplo, en Goodman y otros, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8va edición, Macmillan Publishing Co., 1990.

- Los agentes contra el cáncer incluyen, de manera ilustrativa, acivicina, aclarubicina, acodazol, acronina, adozelesina, aldesleucina, alitretinoína, alopurinol, altretamina, ambomicina, ametantrona, amifostina, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozole, antramycin, trióxido de arsénico, asparaginasa, asperlina,
25 azacitidina, azetepa, azotomicina, batimastat, benzodepa, bevacizumab, bicalutamida, bisantreno, dimesilato de bisnafida, bizelesina, bleomicina, brequinar, bropirimina, busulfano, cactinomicina, calusterona, capecitabina, caracemida, carbetímero, carboplatino, carmustina, carubicina, carzelesina, cedefingol, celecoxib, clorambucilo, cirolemicina, cisplatino, cladribina, mesilato de crisnatol, ciclofosfámid, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, decitabina, dexormaplatino, dezaguanina, mesilato de
30 dezaguanina, diazicon, docetaxel, doxorubicina, droloxifeno, dromostanolona, duazomicina, edatrexate, eflomita, elsamitricina, enloplatino, empromato, epirubicina, erbulozol, esorubicina, estramustina, etanidazol, etopósido, etoprina, fadrozol, fazarabina, fenretinida, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flucitabina, fosquidona, fostriecina, fulvestrant, gemcitabina, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, interleucina II (IL-2, lo que incluye la interleucina recombinante II o rIL2), interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-n1, interferón
35 alfa-n3, interferón beta-1a, interferón gamma-1b, iproplatino, irinotecán, lanreotida, letrozol, leuprolida, liarozol, lometrexol, lomustina, losoxantrona, masoprocol, maitansina, clorhidrato de mecloretamina, megestrol, acetato de melengestrol, melfalan, menogaril, mercaptopurina, metotrexato, metoprina, meturedepa, mitindomida, mitocarcina, mitocromina, mitogilina, mitomalcina, mitomicina, mitosper, mitotano, mitoxantrona, ácido micofenólico, nelarabina, nocodazol, nogalamina, ormaplatino, oxisurano, paclitaxel, pegaspargasa,
40 peliomicina, pentamustina, peplomicina, perfosfamida, pipobromano, piposulfán, clorhidrato de piroxantrona, plicamicina, plomestano, porfímero, porfíromicina, prednimustina, procarbazona, puomicina, pirazofurina, riboprina, roglitimid, safinol, semustina, simtrazeno, esparfosato, esparomicina, espirogermanio, espiromustina, espiroplatino, estreptonigrina, estreptozocina, sulofenur, talisomicina, tamoxifeno, tegogalan, tegafur, teloxantrona, temoporfina, tenipósido, teroxirona, testolactona, tiamiprina, tioguanina, tiotepa,
45 tiazofurina, tirapazamina, topotecan, toremifeno, trestolona, tricitabina, trimetrexato, triptorelina, tubulozole, mostaza uracilo, uredepa, vapreótido, verteporfina, vinblastina, sulfato de vincristina, vindesina, vinepidina, vinorelbina, vinrosidina, vinzolidina, vorozol, zeniplatino, zinostatina, zoledronato y zorubicina.

- Los efectos sinérgicos del tratamiento combinado con una composición farmacéutica que incluye NSC350625 con uno o más agentes contra el cáncer adicionales tales como uno o más inhibidores mitóticos y/o uno o más
50 agentes antiangiogénicos se encuentran inesperadamente como se describe en la presente memoria.

De acuerdo con aspectos de la presente invención, tratar un sujeto que tiene cáncer del CNS, cáncer de pulmón de células no pequeñas o linfoma incluye la administración de una cantidad eficaz terapéuticamente de NSC350625, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo; y un inhibidor mitótico.

- De acuerdo con aspectos de la presente invención, tratar un sujeto que tiene del CNS, cáncer de pulmón de células no pequeñas o linfoma incluye la administración de una cantidad eficaz terapéuticamente de NSC350625, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo; y un inhibidor mitótico de taxano, tal como, paclitaxel y docetaxel.
55

De acuerdo con aspectos de la presente invención, tratar un sujeto que tiene cáncer del CNS, cáncer de pulmón de células no pequeñas o linfoma incluye la administración de una cantidad eficaz terapéuticamente de

NSC350625, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo; y un agente antiangiogénico.

De acuerdo con aspectos de la presente invención, tratar un sujeto que tiene cáncer del CNS, cáncer de pulmón de células no pequeñas o linfoma incluye la administración de una cantidad eficaz terapéuticamente de NSC350625, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo; y un agente antiangiogénico, tal como bevacizumab.

En aspectos particulares de las composiciones de la invención, la cantidad del agente contra el cáncer complementario administrado es menor que una cantidad del agente contra el cáncer complementario necesaria para lograr un efecto terapéutico si se administra sin la administración de una cantidad eficaz terapéuticamente de NSC350625, o sal aceptable farmacéuticamente del mismo. Por lo tanto, en aspectos particulares de las composiciones para uso en la presente invención, la cantidad del agente contra el cáncer complementario en una dosis unitaria de la composición es al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, o al menos 90 %, menos de una cantidad del agente contra el cáncer complementario necesaria para lograr un efecto terapéutico si se administra sin la cantidad eficaz terapéuticamente de NSC350625, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

También se divulga que TRAIL puede inducirse o proporcionarse mediante otros procedimientos o composiciones para administración de NSC350625, tal como mediante la administración de uno o más inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) tales como vorinostat, descritos en Nebbioso, A. y otros, 2005, Nat Med 11, 77-84; uno o más anticuerpos agonistas de TRAIL tales como lexatumumab y mapatumumab; y/o TRAIL recombinante tal como TRAIL adenoviral como se describe en Abdulghani, J. y otros, 2010, Exp. Opin. Ther. Targets 14:1091-1108.

Opcionalmente, tratar un sujeto con cáncer del CNS, cáncer de pulmón de células no pequeñas o linfoma incluye, además, un tratamiento complementario contra el cáncer. Un tratamiento complementario contra el cáncer puede ser un tratamiento de radiación de un sujeto o un área afectada del cuerpo de un sujeto.

La expresión de TRAIL inducida en el sujeto mediante la administración de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es detectable en una muestra obtenida del sujeto, tal como una muestra de sangre obtenida del sujeto.

Los aspectos de la presente invención pueden resultar en la regulación positiva del gen de TRAIL por tejidos normales y tumorales con niveles séricos sostenidos del TRAIL secretado, después de una dosis única de NSC350625, durante 3-4 días. Normalmente la vida media en suero de la proteína TRAIL es de 20-30 minutos.

NSC350625 tiene una masa calculada de 387,21 y cruza la barrera hematoencefálica. La administración de NSC350625 permite la inducción de TRAIL en las células del sistema nervioso central, lo que incluye ilustrativamente las células gliales y las neuronas del cerebro y la médula espinal. Además, la administración de una sal derivada, éster, amida, hidrato, solvato o profármaco aceptable farmacéuticamente de NSC350625, que cruza la barrera hematoencefálica, permite la inducción de TRAIL en las células del sistema nervioso central.

La presente invención incluye composiciones para su uso en métodos de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer del sistema nervioso central (SNC) mediante una vía de administración distinta a la administración directa al SNC.

Los cánceres primarios del SNC y las metástasis del SNC de los cánceres que no son del SNC, también llamados cáncer cerebral en la presente memoria, se tratan de acuerdo con aspectos de la presente invención. Los cánceres primarios del SNC tratados de acuerdo con los aspectos de la presente invención incluyen gliomas, meningiomas, adenomas pituitarios y tumores de la vaina nerviosa. El glioblastoma multiforme es un cáncer primario del SNC tratado de acuerdo con aspectos de la presente invención. Los oligodendrogliomas son cánceres primarios del SNC tratados de acuerdo con aspectos de la presente invención.

La administración de una composición farmacéutica para uso en la presente invención puede ser por una vía de administración que incluye oral, rectal, nasal, pulmonar, epidural, ocular, ótica, intraarterial, intracardíaca, intracerebroventricular, intradérmica, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraósea, intratecal, intravesical, subcutánea, tópica, transdérmica y transmucosa, tal como por vía de administración sublingual, bucal, vaginal e inhalatoria.

Una composición farmacéutica para uso de la presente invención puede estar en cualquier forma de dosificación adecuada para la administración a un sujeto, lo que incluye formas de dosificación sólidas, semisólidas y líquidas tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, supositorios, píldoras, soluciones, suspensiones, pomadas, lociones, cremas, geles, pastas, atomizadores y aerosoles. Los liposomas y las emulsiones son tipos bien conocidos de formulaciones farmacéuticas que pueden usarse para suministrar un agente farmacéutico, particularmente un agente farmacéutico hidrófobo. Las composiciones farmacéuticas para

uso en la presente invención incluyen generalmente un vehículo aceptable farmacéuticamente tal como un excipiente, diluyente y/o vehículo. Pueden usarse formulaciones de liberación retardada de composiciones y sistemas de liberación retardada, tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos.

- Una formulación farmacéutica de una composición para uso en la presente invención puede incluir un vehículo aceptable farmacéuticamente. El término "vehículo aceptable farmacéuticamente" se refiere a un vehículo que es adecuado para su uso en un sujeto sin toxicidad o irritación indebida para el sujeto y que es compatible con otros ingredientes incluidos en una composición farmacéutica.

- Los vehículos aceptables farmacéuticamente, los procedimientos para preparar las composiciones farmacéuticas y las diversas formas de dosificación, así como también los modos de administración se conocen bien en la técnica, por ejemplo, como se detalla en *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, eds. H. A. Lieberman y otros, Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 1989; y en L.V. Allen, Jr. y otros, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 8va edición, Filadelfia, PA: Lippincott, Williams y Wilkins, 2004; A. R. Gennaro, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams y Wilkins, 21ra ed., 2005, particularmente el capítulo 89; y J. G. Hardman y otros, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill Professional, 10ma ed., 2001.

Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con aspectos de la presente invención se formulan para la administración oral.

- Una forma de dosificación sólida para la administración o suspensión en un líquido antes de la administración incluye ilustrativamente cápsulas, comprimidos, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, uno o más agentes activos se mezclan con al menos un vehículo que incluye ilustrativamente un tampón tal como, por ejemplo, citrato de sodio o un fosfato de metal alcalino, lo que incluye ilustrativamente fosfatos de sodio, fosfatos de potasio y fosfatos de calcio; una carga tal como, por ejemplo, almidón, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico; un aglutinante tal como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y acacia; un humectante tal como, por ejemplo, glicerol; un agente desintegrante tal como, por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, almidones vegetales tales como almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos complejos y carbonato de sodio; un retardador de solución tal como, por ejemplo, parafina; un acelerador de absorción tal como, por ejemplo, un compuesto de amonio cuaternario; un agente humectante tal como, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol y un glicol; un adsorbente tal como, por ejemplo, caolín y bentonita; un lubricante tal como, por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, un polietilenglicol sólido o laurilsulfato de sodio; un conservante tal como un agente antibacteriano y un agente antifúngico, lo que incluye, por ejemplo, ácido sórbico, gentamicina y fenol; y un estabilizador tal como, por ejemplo, sacarosa, EDTA, EGTA y un antioxidante.

- Las formas de dosificación sólidas incluyen opcionalmente un revestimiento tal como un revestimiento entérico. El revestimiento entérico es típicamente un material polimérico. Los materiales de revestimiento entérico preferentes tienen las características de ser polímeros bioerosionables, gradualmente hidrolizables y/o gradualmente solubles en agua. La cantidad de material de revestimiento aplicado a una dosificación sólida dicta generalmente el intervalo de tiempo entre la ingestión y la liberación del fármaco. Se aplica un revestimiento que tiene un grosor tal que todo el revestimiento no se disuelve en los fluidos gastrointestinales a un pH inferior a 3 asociado con los ácidos estomacales, sino que se disuelve por encima de pH 3 en el ambiente del intestino delgado. Se espera que cualquier polímero aniónico que exhiba un perfil de solubilidad dependiente del pH se use fácilmente como un revestimiento entérico en la práctica de la presente invención para lograr la administración del agente activo al tracto gastrointestinal inferior. La selección del material de revestimiento entérico específico depende de propiedades tales como la resistencia a la desintegración en el estómago; impermeabilidad a fluidos gástricos y difusión del agente activo mientras está en el estómago; capacidad de disiparse en el sitio del intestino objetivo; estabilidad física y química durante el almacenamiento; ausencia de toxicidad; y facilidad de aplicación.

- Los materiales de revestimiento entérico adecuados incluyen ilustrativamente polímeros celulósicos tales como hidroxipropil celulosa, hidroxietil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, metil celulosa, etil celulosa, acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, acetato trimelitato de celulosa, hidroxipropilmetil ftalato de celulosa, hidroxipropilmetil succinato de celulosa y carboximetilcelulosa de sodio; polímeros y copolímeros de ácido acrílico, preferentemente formados a partir de ácido acrílico, ácido metacrílico, acrilato de metilo, metilacrilato de amonio, acrilato de etilo, metacrilato de metilo y/o etilo; polímeros y copolímeros de vinilo tales como polivinilpirrolidona, acetato de polivinilo, ftalato de acetato de polivinilo, copolímero de ácido crotonico y acetato de vinilo y copolímeros de etileno-acetato de vinilo; goma laca; y combinaciones de los mismos. Un material de revestimiento entérico particular incluye polímeros y copolímeros de ácido acrílico descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos núm. 6,136,345.

- El revestimiento entérico contiene opcionalmente un plastificante para evitar la formación de poros y grietas que permiten la penetración de los fluidos gástricos en la forma de dosificación sólida. Los plastificantes adecuados incluyen, ilustrativamente, citrato de trietilo (Citroflex 2), triacetina (triacetato de glicerilo), citrato de trietil acetilo (Citroflex A2), Carbowax 400 (polietilenglicol 400), ftalato de dietilo, citrato de tributilo,

monoglicéridos acetilados, glicerol, ésteres de ácidos grasos, propilenglicol y ftalato de dibutilo. En particular, un revestimiento compuesto de un polímero acrílico carboxílico aniónico típicamente contiene aproximadamente 10 % a 25 % en peso de un plastificante, particularmente ftalato de dibutilo, polietilenglicol, citrato de trietilo y triacetina. El revestimiento puede contener, además, otros excipientes de revestimiento, tales como antiadherentes, agentes antiespumantes, lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio) y estabilizadores (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, ácidos o bases) para solubilizar o dispersar el material de revestimiento y para mejorar el rendimiento del revestimiento y el producto revestido.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen uno o más agentes activos y un vehículo aceptable farmacéuticamente formulado como una emulsión, solución, suspensión, jarabe o elixir. Una forma de dosificación líquida de una composición de la presente invención puede incluir un colorante, un estabilizador, un agente humectante, un agente emulsionante, un agente de suspensión, un edulcorante, un saborizante o un agente perfumante.

Por ejemplo, una composición para la administración parenteral puede formularse como un líquido inyectable. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles tales como propilenglicol, polietilenglicol, glicerina, y similares, mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tal como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. Una fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula conveniente en el caso de las dispersiones, y/o mediante el uso de un tensioactivo, tal como laurilsulfato de sodio. Se incluye opcionalmente un estabilizador tal como, por ejemplo, sacarosa, EDTA, EGTA y un antioxidante.

Para la administración tópica, puede formularse una composición para la administración a la piel, tal como para efecto local, y/o como una formulación de "parche" para la administración transdérmica. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración tópica incluyen, por ejemplo, pomadas, lociones, cremas, geles, pastas, aerosoles y polvos. Las pomadas, lociones, cremas, geles y pastas pueden incluir, además de uno o más agentes activos, una base tal como una base de absorción, una base removible con agua, una base soluble en agua o una base oleaginosa y excipientes tales como un agente espesante, un agente gelificante, un colorante, un estabilizador, un agente emulsionante, un agente de suspensión, un edulcorante, un saborizante o un agente perfumante.

Las formulaciones transdérmicas pueden incluir potenciadores de la absorción percutánea tales como acetona, azona, dimetil acetamida, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etanol, ácido oleico, polietilenglicol, propilenglicol y laurilsulfato de sodio. Pueden usarse la iontoforesis y/o la sonoforesis para mejorar el suministro transdérmico.

Los polvos y aerosoles para la administración tópica de uno o más agentes activos pueden incluir excipientes tales como talco, lactosa y uno o más ácidos silícicos. Los aerosoles pueden incluir un propelente farmacéutico tal como un propelente de hidrocarburo fluorado, dióxido de carbono o un gas adecuado. Alternativamente, puede suministrarse un aerosol desde un dispositivo de atomización tipo bomba que no requiere un propelente. Un dispositivo de atomización administra una dosis medida de una composición contenida en el mismo, por ejemplo, mediante el uso de una válvula para la regulación de una cantidad suministrada.

Las formulaciones oftálmicas de uno o más agentes activos pueden incluir ingredientes tales como un conservante, un tampón y un agente espesante.

Los agentes tensioactivos adecuados útiles como vehículo o excipiente aceptable farmacéuticamente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen tensioactivos no iónicos, catiónicos y/o aniónicos que tienen buenas propiedades emulsionantes, dispersantes y/o humectantes. Los tensioactivos aniónicos adecuados incluyen tanto jabones emulsionantes en agua como agentes tensioactivos sintéticos solubles en agua. Los jabones adecuados son sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, sales de amonio no sustituidas o sustituidas de ácidos grasos superiores (C10-C22), por ejemplo, las sales de sodio o potasio de ácido oleico o esteárico, o de mezclas de ácidos grasos naturales que pueden obtenerse de aceite de coco o aceite de sebo. Los tensioactivos sintéticos incluyen sales de sodio o calcio de ácidos poliacrílicos; sulfonatos y sulfatos grasos; derivados de bencimidazol sulfonados y alquilarilsulfonatos. Los sulfonatos o sulfatos grasos están generalmente en forma de sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, sales de amonio no sustituidas o sales de amonio sustituidas con un radical alquilo o acilo que tiene de 8 a 22 átomos de carbono, por ejemplo, la sal de sodio o calcio del ácido lignosulfónico o ácido dodecilsulfónico o una mezcla de sulfatos de alcohol graso obtenidos de ácidos grasos naturales, sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de ésteres de ácido sulfúrico o sulfónico (tal como laurilsulfato de sodio) y ácidos sulfónicos de aductos de alcohol graso/óxido de etileno. Los derivados de bencimidazol sulfonados adecuados contienen preferentemente de 8 a 22 átomos de carbono. Ejemplos de alquilarilsulfonatos son las sales de sodio, calcio o alcanolamina de ácido dodecilsulfónico o ácido dibutilnaftalenosulfónico o un producto de condensación de ácido naftalenosulfónico/formaldehído. Además, son adecuados los fosfatos correspondientes, por ejemplo, sales de éster de ácido fosfórico y un aducto de p-nonilfenol con óxido de etileno y/o propileno, o fosfolípidos. Los fosfolípidos adecuados para este propósito son los fosfolípidos naturales (que se originan de células animales o vegetales) o sintéticos de tipo cefalina o lecitina, tales como, por ejemplo, fosfatidiletanolamina,

fosfatidilserina, fosfatidilglicerina, lisolecitina, cardiolipina, dioctanilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y mezclas de los mismos.

Los tensioactivos no iónicos adecuados útiles como vehículos o excipientes aceptables farmacéuticamente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen derivados polietoxilados y polipropoxilados de alquilfenoles, alcoholes grasos, ácidos grasos, aminas alifáticas o amidas que contienen al menos 12 átomos de carbono en la molécula, alquilarenosulfonatos y dialquilsulfosuccinatos, tales como derivados de poliglicoléter de alcoholes alifáticos y cicloalifáticos, ácidos grasos saturados e insaturados y alquilfenoles, dichos derivados contienen preferentemente de 3 a 10 grupos de éter de glicol y de 8 a 20 átomos de carbono en el resto hidrocarbonado (alifático) y de 6 a 18 átomos de carbono en el resto alquilo del alquilfenol. Otros tensioactivos no iónicos adecuados son aductos solubles en agua de óxido de polietileno con polipropilenglicol, etilendiaminopolipropilenglicol que contiene de 1 a 10 átomos de carbono en la cadena de alquilo, cuyos aductos contienen de 20 a 250 grupos de etilenglicol éter y/o de 10 a 100 grupos de propilenglicol éter. Dichos compuestos contienen generalmente de 1 a 5 unidades de etilenglicol por unidad de propilenglicol. Ejemplos representativos de tensioactivos no iónicos son nonilfenol-polietoxietanol, éteres poliglicólicos de aceite de ricino, aductos de polipropileno/óxido de polietileno, tributilfenoxipolietoxietanol, polietilenglicol y octilfenoxipolietoxietanol. Los ésteres de ácido graso de polietilensorbitano (tal como el trioleato de polioxietilensorbitano), glicerol, sorbitano, sacarosa y pentaeritritol también son tensioactivos no iónicos adecuados.

Los tensioactivos catiónicos adecuados útiles como vehículos o excipientes aceptables farmacéuticamente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen sales de amonio cuaternario, preferentemente haluros, que tienen 4 radicales hidrocarbonados opcionalmente sustituidos con halo, fenilo, fenilo sustituido o hidroxilo; por ejemplo, sales de amonio cuaternario que contienen como sustituyente en N al menos un radical alquilo C8-C22 (por ejemplo, cetilo, laurilo, palmitilo, miristilo, oleilo y similares) y, como substituyentes adicionales, alquilo inferior no sustituido o halogenado, bencilo y/o radicales hidroxilo-alquilo inferior.

Puede encontrarse una descripción más detallada de los agentes tensioactivos adecuados para este propósito, por ejemplo, en "McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual" (MC Publishing Corp., Ridgewood, Nueva Jersey, 1981), "Tensid-Taschenbuch", 2da ed. (Hanser Verlag, Viena, 1981) y "Encyclopaedia of Surfactants (Chemical Publishing Co., Nueva York, 1981).

Pueden incluirse agentes formadores de estructura, espesantes o formadores de gel en las composiciones farmacéuticas y preparaciones combinadas de la invención. Dichos agentes adecuados son en particular ácido silícico altamente disperso, tal como el producto disponible comercialmente bajo el nombre comercial Aerosil; bentonitas; sales de tetraalquil amonio de montmorillonitas (por ejemplo, productos disponibles comercialmente con el nombre comercial Bentone), en el que cada uno de los grupos alquilo puede contener de 1 a 20 átomos de carbono; alcohol cetoestearílico y productos de aceite de ricino modificado (por ejemplo, el producto disponible comercialmente con el nombre comercial Antisettle).

En aspectos particulares, un vehículo aceptable farmacéuticamente es un vehículo particulado tal como partículas lipídicas lo que incluyen liposomas, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares; partículas poliméricas tales como partículas de hidrogel, partículas de ácido poliglicólico o partículas de ácido poliláctico; partículas inorgánicas tales como partículas de fosfato de calcio tal como se describe en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos núm. 5,648,097; y vehículos particulados inorgánicos/orgánicos tales como los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos núm. 6,630,486.

Puede seleccionarse un vehículo particulado aceptable farmacéuticamente entre una partícula lipídica; una partícula polimérica; una partícula inorgánica; y una partícula inorgánica/orgánica. Además, puede incluirse una mezcla de tipos de partículas como un vehículo particulado aceptable farmacéuticamente.

Un vehículo particulado se formula típicamente de manera que las partículas tienen un tamaño de partícula promedio en el intervalo de aproximadamente 1 nm - 10 micrómetros. En aspectos particulares, un vehículo particulado se formula de manera que las partículas tienen un tamaño de partícula promedio en el intervalo de aproximadamente 1 nm - 100 nm.

La dosificación de una composición farmacéutica de la invención para su uso variará en función de factores tales como, pero no está limitada a, la vía de administración; la edad, la salud, el sexo y el peso del sujeto a quien se le administrará la composición; la naturaleza y el grado de los síntomas del sujeto, si los hay, y el efecto deseado. La dosis puede ajustarse en dependencia de si el tratamiento será agudo o continuo. Un experto en la técnica puede determinar una cantidad eficaz farmacéuticamente en vista de estas y otras consideraciones típicas en la práctica médica.

En general, se contempla que una dosis diaria de una composición farmacéutica de la invención esté en el intervalo de aproximadamente 0,001 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal de un sujeto. Puede administrarse una dosis diaria como dos o más dosis divididas para obtener el efecto deseado. Una

composición farmacéutica de la invención puede formularse, además, para liberación sostenida para obtener los resultados deseados.

Información detallada sobre los ingredientes, equipos y procedimientos habituales para preparar formas de dosificación se encuentra en *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, eds. H. A. Lieberman y otros, Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 1989; y en L.V. Allen, Jr. y otros, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 8va edición, Filadelfia, PA: Lippincott, Williams y Wilkins, 2004; A. R. Gennaro, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams y Wilkins, 21ra ed., 2005, particularmente el capítulo 89; y J. G. Hardman y otros, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill Professional, 10ma ed., 2001.

- 10 Los paquetes comerciales incluyen una composición farmacéutica descrita en la presente memoria. Pueden incluirse instrucciones para administrar la composición farmacéutica.

Se describe un paquete comercial que incluye NSC350625 o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo; y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

- 15 Uno o más componentes auxiliares se incluyen opcionalmente en paquetes comerciales, tal como un tampón o diluyente.

Los aspectos de las composiciones y procedimientos de la invención se ilustran en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Reactivos y ensayos basados en células

- 20 Todas las líneas celulares se obtuvieron de ATCC excepto las células HCT116 Bax^{-/-} y HCT116 p53^{-/-} obtenidas de Bert Vogelstein (Universidad Johns Hopkins, Baltimore, MA) y líneas celulares GBM obtenidas de Akiva Mintz (Universidad Wake Forrest, Winston-Salem, NC). La infección lentiviral se llevó a cabo con células MDA-MB-231 mediante el uso de ARNhc de TRAIL o vector y HCT116 mediante el uso de ARNhc de Foxo3a o vector adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Las células H460 DR5ADD-EGFP se construyeron mediante el uso de ADNc que codifica un fragmento DR5 sin dominio de muerte mediante la inserción de los aminoácidos 1 a 298 del gen DR5 humano en el vector pEGFP-N1 para expresar una proteína de fusión DR5(1-298). El constructo de fusión se transfectó en células H460 con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se seleccionó con G418. Los clones positivos se verificaron mediante microscopía de fluorescencia y análisis por transferencia de Western. La detección por bioluminiscencia de alto rendimiento mediante el uso del conjunto de diversidad II de NCI se llevó a cabo en células HCT116 Bax^{-/-} que se cotransfectaron de manera estable para expresar un constructo de luciferasa de luciérnaga bajo el control transcripcional de los primeros 504 pares de bases del promotor TRAIL aguas arriba del inicio de la transcripción del gen de TRAIL humano. Los compuestos se probaron a una concentración de trabajo de 20 nM, 200 nM, 500 nM y 1 µM con evaluación por bioluminiscencia de la actividad transcripcional a las 12, 24, 36 y 48 horas después del tratamiento. Los detalles de la metodología de detección se describen en Wang y otros, 2006, PNAS 103:11003-11008). NSC350625 se obtuvo del DTP del NCI, se reconstituyó en DMSO a 20 mM, se dividió en alícuotas y se almacenó a -20 °C. A6730 y el monoetanolato de U0126 se obtuvieron de Sigma. El TRAIL recombinante purificado se produjo como se describe en Kim y otros, 2004, J. of Biol. Chem. 279:40044-40052. El anticuerpo RIK-2 (Santa-Cruz Biotechnology) se usó a 1 µg/ml y zVAD-fmk (Promega) se usó a 20 µM.

Muestras primarias de pacientes humanos

- 40 Todas las muestras primarias de pacientes humanos se recibieron inmediatamente después de la resección, se digirieron manualmente en DMEM completo, se filtraron con una malla de nailon de 100 µm y se colocaron en placas a 2X10⁵ células/ml en DMEM completo para su uso en los ejemplos descritos en la presente memoria.

Ratones

- 45 Para los xenoinjertos subcutáneos, se inocularon ratones atímicos nu/nu hembras de 4-6 semanas de edad (Charles 50.River Laboratories) con 1X10⁶ células (2,5X10⁶ para T98G) de líneas celulares indicadas en cada flanco trasero como una suspensión de 200 µl de Matrigel(BD):PBS 1:1. Todas las inyecciones intraperitoneales e intravenosas se administraron a un volumen total de 200 µl. Las formulaciones orales de NSC350625 se administraron mediante el uso de una sonda oral y se administraron como una suspensión de 200 µl que contenía 20 % de Cremophor EL® (Sigma), 10 % de DMSO y 70 % de PBS. Los tumores se monitorearon mediante el uso de calibradores digitales en los puntos temporales indicados. Todos los tumores subcutáneos se dejaron establecer durante 1-4 semanas después de la inyección hasta alcanzar un volumen de ~125 mm³ antes del inicio del tratamiento. La disminución de la carga tumoral se monitoreó durante 3 semanas después de la desaparición del tumor y se confirmó por inspección visual después de la eutanasia.
- 55 La implantación intracecal se realizó como se describe en Cespedes, M.V., y otros, Am J Pathol, 2007, 170(3):

págs. 1077-1085.

- Para los xenoinjertos intracraneales, ratones desnudos atímicos anestesiados se implantaron con 2×10^5 células SF767 en una suspensión de 25 μ l de RPMI libre de suero y de antibiótico. El sitio de inyección fue un agujero de trépano creado 1 mm lateral a la línea media del cráneo y 1 mm anterior a la sutura coronal. La inyección se administró gradualmente durante 5 minutos con una jeringa Hamilton y el orificio de trépano se selló mediante el uso de cera para huesos. El crecimiento del tumor se evaluó mediante obtención de imágenes bioluminiscentes 2 semanas después de la implantación. La obtención de imágenes bioluminiscentes de los tumores se llevó a cabo en un sistema de obtención de imágenes IVIS como se describe en Wang y otros, 2003, PNAS 100:15095-15100.
- La obtención de imágenes de infrarrojo cercano de ratones se llevó a cabo en un sistema de obtención de imágenes Pearl Impulse (LI-COR) después de la inyección en la vena de la cola de AngioSense® 680 (VisEn Medical, Woburn, MA) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los ratones Eµmyc de 6 semanas de edad se obtuvieron del Laboratorio Jackson (B6.Cg-Tg(IghMyc)22Bri/J).
- Para los ensayos de CBC/diferencial y de química del suero, se colectó 1 ml de sangre de ratones anestesiados mediante punción cardíaca terminal del ventrículo izquierdo. Para la química del suero, se colocaron 500 μ l en un tubo de microcentrífuga y se dejaron coagular durante 30 minutos a temperatura ambiente seguido de centrifugación. Se extrajo el suero, se centrifugó nuevamente para eliminar cualquier coágulo adicional, y el suero se envió para análisis. Para CBC/diferenciales, se recolectaron 500 μ l de sangre en tubos con EDTA y se analizaron.
- Análisis estadístico.** Para las comparaciones pareadas, los datos se analizaron mediante la prueba t de Student de dos colas mediante el uso de Excel (Microsoft). El análisis estadístico de rango logarítmico se realizó mediante el uso de un script basado en la web que interactúa con el paquete estadístico R.

RT-qPCR

- El ARN total se extrajo mediante el uso del minikit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se generó ADNc mediante el uso de SuperScript II (Invitrogen) con 1 μ g de ARN y oligodT. Los cebadores fueron: TRAIL directo (CAGAGGAAGAAGCAACACATT, SEQ ID NO:1), TRAIL inverso (GGTTGATGATTCCAGGAGTTTATTTTG, SEQ ID NO:2), GAPDH directo (CCACATCGCTCAGACACCAT, SEQ ID NO:3), GAPDH inverso (GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT, SEQ ID NO:4). La amplificación por PCR se realizó con el sistema de detección rápida en tiempo real 7900HT de Applied Biosystems. Las muestras se estandarizaron a 10 ng/ μ l y después se usaron veinte ng de ADNc por muestra como plantilla para el PCR en tiempo real mediante el uso de una mezcla SYBR Green Master (Qiagen Corp, EE.UU.). Las muestras se normalizaron con respecto a GAPDH usado en condiciones idénticas. La cuantificación usó el procedimiento $2\Delta\Delta C_t$ del cruce de umbrales descritos en Livak y otros, 2001, Methods. Diciembre de 2001;25(4):402-8, con GAPDH como control endógeno para la normalización. Las reacciones se realizaron en placas ópticas de 384 pocillos en un instrumento 7900HT (Applied Biosystems), con volúmenes de reacción de 10 μ l. El análisis de datos usó el programa informático del sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7900 2.2. Para excluir la posibilidad de contaminación del ADN genómico, se realizaron, además, reacciones de PCR de control sin plantilla de ADNc y muestras de control sin RT para cada conjunto de cebadores específicos de gen. Se realizaron cuadruplicados de cada reacción de PCR y se promediaron los datos resultantes.

Inmunofluorescencia

- Las líneas celulares indicadas se propagaron en crecimiento en fase logarítmica en placas de seis pocillos en presencia o ausencia de NSC350625 a las concentraciones de trabajo indicadas durante 72 h. Las células se fijaron y se permeabilizaron mediante el uso de la solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células se incubaron con anti-TRAIL (ab2435, Abcam, Cambridge, MA) a 1:100 o anti-caspasa activa-3(559565, BD Pharmingen, San Diego, CA) a 1:250 en solución Perm/Wash (BD Biosciences) durante 1 h en ausencia de luz. Se incubó Alexa Fluor 488 anti-conejo a 1:200 en solución Perm/Wash durante 20 minutos a temperatura ambiente y se enjuagó en PBS. Se usó Hoechst 33342 (Invitrogen) como una contratinción nuclear de acuerdo con el protocolo del fabricante. La obtención de imágenes por fluorescencia se realizó en un microscopio invertido Axiovert (Carl Zeiss MicroImaging) mediante el uso de un sistema de obtención de imágenes iVision (Biovision).

Citometría de flujo y ensayos de muerte celular

- Para todos los análisis de citometría de flujo, las células flotantes y adherentes se analizaron en un citómetro Coulter- Beckman Elite Epics. Para los experimentos de TRAIL en superficie, las células adherentes se recolectaron mediante tripsinización breve, se fijaron en paraformaldehído al 4 % en PBS durante 20 min, se incubaron con un anticuerpo anti- TRAIL durante 2 horas (Abcam), se lavaron y se incubaron con Alexafluor 488 anti-conejo (Invitrogen) durante 30 min, y se analizaron. Las células se clasificaron por dispersión frontal y lateral para eliminar los desechos y las células muertas del análisis. Los datos de TRAIL en superficie se

expresan como la mediana de intensidad de fluorescencia con respecto a la de las muestras de control, a menos que se indique lo contrario. Para Sub-G1 y los experimentos del perfil del ciclo celular, se sedimentaron todas las células y se fijaron con etanol seguido de tinción con yoduro de propidio (Sigma) en presencia de ARNasa. Los ensayos de viabilidad celular se llevaron a cabo en placas de fondo transparente con paredes

5 negras de 96 pocillos mediante el uso de CellTiter-Glo® (Promega) de acuerdo con los protocolos del fabricante. La obtención de imágenes y la cuantificación de estos ensayos se realizaron en un sistema de obtención de imágenes IVIS (Xenogen).

Ensayos de formación de colonias

Las líneas celulares indicadas se colocaron en placas a 500 células por pocillo y se trataron al día siguiente en medios completos nuevos después de la adherencia. A los 3 días después del tratamiento, los medios se reemplazaron con medios libres de fármaco y las células se propagaron durante 10 días con medios frescos administrados una vez cada 3 días. Al final del período de 10 días, las células se lavaron en PBS, se fijaron con metanol y se tiñeron con azul Coomassie, se enjuagaron y se secaron para su cuantificación.

Análisis de tejidos. Los ratones se sacrificaron humanitariamente en los puntos temporales indicados y el tejido normal o los tumores extirpados se fijaron en paraformaldehído/PBS al 4 % durante toda la noche a 4 °C. Si se deseaban muestras de plasma, se recolectaron 500 µl de sangre mediante punción cardíaca terminal con anestesia en tubos EDTA-Vacutainer (BD). Se recolectaron muestras de suero de manera similar pero en tubos de microcentrífuga seguido de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la coagulación. A continuación, se extrajo el suero después de centrifugación durante 5 minutos. Se prepararon

15 bloques embebidos en parafina, láminas portaobjetos de cortes en serie y tinción con hematoxilina y eosina de acuerdo con procedimientos estándar. La tinción de TUNEL se realizó mediante el uso del kit de detección de apoptosis in situ de peroxidasa ApopTag® (Millipore). Para el análisis por IHC, las láminas portaobjetos se desparafinaron en xileno y se hidrataron en un gradiente decreciente de etanol. La recuperación de antígeno se llevó a cabo mediante la ebullición en ácido cítrico 10 mM (pH 6,0) durante 6 min. Las muestras se

20 bloquearon con soluciones de bloqueo de estreptavidina y de biotina y suero de cabra (Vector Laboratories). Los anticuerpos primarios se incubaron durante toda la noche a 4 °C en una cámara de humedad. La incubación con anticuerpo secundario biotinilado y la deposición de DAB se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante (kit de sustrato DAB para peroxidasa de Vector Laboratories). Las muestras se contratiñeron con hematoxilina (DAKO) durante 6 min, se enjuagaron en dH₂O durante 5 minutos, se enjuagaron con PBS, y se deshidrataron y sellaron con cubreobjetos. Las imágenes se registraron en un microscopio Axioskop mediante el uso del programa informático QCapture (QImaging).

Cocultivos

Se realizaron cocultivos de células HCT116 p53^{-/-} y HFF en una mezcla 1:1 de DMEM completo y medio 5A de McCoy. Para las imágenes de fluorescencia, las dos células se marcaron por separado mediante el uso de los

35 kits de conectores de células fluorescentes para el marcaje de genes de la membrana celular (Sigma) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las células se contratiñeron con Hoechst 33342 como se describe en la sección de inmunofluorescencia. Para el análisis por citometría de flujo de la muerte celular, las dos poblaciones de células se determinaron por dispersión de luz diferencial y se analizaron como se describe para el análisis por sub-G1 en la sección de ensayos de muerte celular.

ELISA

El ELISA para TRAIL se llevó a cabo mediante el uso del kit TRAIL/TNFSF10 Quantikine® de acuerdo con el protocolo del fabricante (DTRL00, R&D systems, Minneapolis, MN). La corrección óptica se realizó según lo sugerido por el fabricante con absorbancia a 540 nm. Las absorbancias se midieron con un lector de placas DTX 880 (Beckman Coulter).

Análisis Farmacocinético de NSC350625

El perfil de absorbancia de NSC350625 se determinó en un espectrómetro Gene Spec III (Hitachi Solutions American, 45.San Francisco sur, CA). El análisis por HPLC se realizó mediante detección de absorbancia a 239 nm en un sistema de la serie Agilent 1200 (Agilent, Santa Clara, CA) mediante el uso de una columna Eclipse XDB -C18 (Agilent) y un bucle de inyección de 100 µl. La elución isocrática a 1 ml/minuto se llevó a

50 cabo en ácido trifluoroacético al 0,1 % en dH₂O. Se llevó a cabo un gradiente de acetonitrilo (ACN) para elución como ACN 15-20 % a los 0-5 minutos, 20-23 % durante 5- 12 minutos, 25 % durante 12-18 minutos. La curva estándar se generó al añadir concentraciones de NSC350625 en plasma cosechado de ratones atímicos desnudos de experimentos no relacionados. Para todas las muestras de plasma, la sangre se obtuvo por punción cardíaca terminal del ventrículo izquierdo y se recolectó en tubos con EDTA (BD). Las muestras se

55 centrifugaron a 500 x g durante 10 minutos. El plasma se desproteinizó mediante la adición de 30 µl de ácido perclórico a 100 µl de muestras, se agitó en vórtex durante 15 segundos, se centrifugó durante 2 minutos y el sobrenadante se inyectó inmediatamente en la HPLC. El AUC se normalizó con respecto a un máximo sérico interno con un tiempo de retención de 8,1 minutos. Los datos de AUC frente al tiempo se ajustaron con un

modelo abierto de dos compartimentos con eliminación de primer orden del compartimento central mediante el uso de la ecuación $AUC = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ donde t = tiempo y A y B son las concentraciones extrapoladas al inicio de las dos fases (distribución y eliminación). Semividas calculadas como $t_{1/2\alpha} = 0,693/\alpha$ y $t_{1/2\beta} = 0,693/\beta$. Otras ecuaciones usadas para el cálculo incluyen $CL = \text{dosis}/AUC_{0-\infty}$ y $V_d = \text{dosis}/(AUC_{0-\infty} \times \beta)$.

5 Análisis de expresión génica

Las células HCT116 p53^{-/-} se cultivaron en la fase logarítmica y se trataron con DMSO o NSC350625 (10 μ M). A las 48 h, se aisló el ARN mediante el uso del minikit RNeasy (Qiagen). El análisis de microarreglos se realizó mediante el uso del Illumina HT-12 Beadchip (Illumina). La calidad y concentración de ARN se evaluó mediante el uso de un bioanalizador Agilent 2100 con ARN Nano LabChip® (Agilent). El ARNc se sintetizó mediante la amplificación TotalPrep™ (Ambion) a partir de 500 ng de ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó la transcripción inversa cebada con oligo T7 (dT) para producir ADNc de primera cadena. Después, el ADNc se sometió a síntesis de segunda cadena y degradación de ARN por ADN polimerasa y ARNasa H, seguido de limpieza por filtración. Se empleó la transcripción *in vitro* (IVT) para generar múltiples copias de ARNc biotinilado. El ARNc marcado se purificó mediante el uso de filtración, se cuantificó mediante NanoDrop y se ajustó el volumen para un total de 750 ng/muestra. Las muestras se fragmentaron y desnaturalizaron antes de la hibridación durante 18 h a 58 °C. Después de la hibridación, las microesferas se lavaron y se marcaron con fluorescencia. Las microesferas se escanearon con un lector BeadArray (Illumina). Se creó un proyecto con los datos de la exploración resultantes importados a GenomeStudio 1.0 (Illumina). Los resultados se exportaron a GeneSpring Gx11 (Agilent Technologies). Las mediciones inferiores a 0,01 se ajustaron a 0,01, las matrices se normalizaron con respecto al percentil 50^{ta} y los genes individuales se normalizaron con respecto a la mediana de los controles. Para el análisis de la red de cambios transcripcionales inducidos por NSC350625, el conjunto de datos se analizó mediante el uso del programa informático Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems).

Análisis por transferencia de Western

El análisis por transferencia de Western se realizó como se describe en Wang, W. y otros, PNAS 103, 11003-11008, 2006, mediante el uso de NuPAGE 4-12 % Bis-Tris y se visualizó mediante el uso de Supersignal West Femto (Thermo Scientific) y película de rayos X. Los extractos nucleares y citoplasmáticos se prepararon mediante el uso de un tampón de lisis citoplasmática (HEPES 10 mM, KCl 10 mM y MgCl 2 mM2, DTT 1 mM) seguido de un tampón de lisis nuclear (HEPES 20 mM, NaCl 420 mM, MgCl 1,5 mM2, EDTA 250 μ M, glicerol al 25 %). Para todos los tampones de lisis, se añadió un inhibidor de proteasa fresco (Roche) y ortovanadato de sodio 1 mM inmediatamente antes de su uso.

Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se llevaron a cabo como se describe para el promotor TRAIL en Nebbioso, A., y otros, Nat Med, 11(1), 77-84, 2005 mediante el uso de un anticuerpo de grado ChIP para Foxo3a (Abcam) o una concentración equivalente de IgG de conejo (SouthernBiotech) como control no específico.

NSC350625 provoca la inducción transcripcional independiente de p53 del gen de TRAIL.

Un tamiz de indicador de bioluminiscencia basado en células realizado en células de cáncer de colon humano HCT116 Bax-null resistentes a TRAIL mediante el uso del promotor del gen de TRAIL produjo la molécula pequeña NSC350625 como un compuesto inductor de TRAIL.

NSC350625 indujo la actividad transcripcional dependiente del promotor de TRAIL de un constructo indicador de luciferasa bajo el control regulador de los primeros 504 pares de bases del promotor de TRAIL que excluye el elemento de respuesta de unión al ADN p53 identificado en Takimoto y otros, 2000, Oncogene 19, 1735-1743. La Figura 1 es un gráfico que muestra la actividad del indicador de luciferasa en células HCT116 Bax^{-/-} bajo el control transcripcional de los primeros 504 pares de bases del promotor del gen de TRAIL humano aguas arriba del inicio de la transcripción (n=3). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. * $P < 0,05$ entre la condición indicada y los controles.

NSC350625 provocó un aumento dependiente de la dosis del ARN mensajero de TRAIL. La Figura 2 es un gráfico que muestra el análisis por RT-qPCR de los niveles de ARNm de TRAIL en células HCT116 p53^{-/-} (48 h, n=4). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. NSC350625 provocó un aumento dependiente de la dosis en la proteína TRAIL localizada en la superficie celular de varias líneas de células cancerosas de manera independiente de p53. La Figura 3 es un gráfico que muestra los niveles de TRAIL en superficie inducidos por NSC350625 en un panel de células cancerosas (10 μ M, 72 h, n=3). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. * $P < 0,05$ entre la condición indicada y los controles.

La exposición a NSC350625 conduce a una presencia significativa y sostenida de TRAIL en la superficie celular de las células cancerosas. Un análisis de curso de tiempo encontró que TRAIL se localizó en la superficie

celular como un evento tardío, pero que esta inducción podría mantenerse temporalmente incluso después de la eliminación de NSC350625 de los medios. La Figura 4 es un gráfico que muestra los niveles de TRAIL en superficie en células HCT116 p53^{-/-} después del tratamiento con NSC350625 en las condiciones y puntos temporales indicados (n=3). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. *P < 0,05 entre la condición indicada y los controles. La Figura 5 es un gráfico que muestra los niveles de TRAIL en superficie en células HCT116 p53^{-/-} por citometría de flujo a las 72 h después del inicio del tratamiento con NSC350625 (5 µM, n=3). Las células se trataron durante el tiempo indicado de preincubación y después se intercambiaron los medios libres de fármaco durante el período de tiempo restante hasta el análisis a las 72

h. Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. *P < 0,05 entre la condición indicada y los controles.

10 NSC350625 induce apoptosis mediada por TRAIL

NSC350625 indujo contenido de ADN por sub-G1 lo que sugiere la muerte celular en células HCT116 p53^{-/-} sensibles a TRAIL sin alterar los perfiles del ciclo celular de fibroblastos normales a dosis equivalentes. La Figura 6 muestra los perfiles del ciclo celular de células HCT116 p53^{-/-} y HFF tratadas con NSC350625 (5 µM, 72 h, n=3).

15 NSC350625 disminuyó la supervivencia clonogénica de las líneas de células cancerosas al tiempo que preservó los fibroblastos normales. La Figura 7 es un gráfico que muestra la cuantificación de los ensayos de formación de colonias de células cancerosas tratadas con NSC350625 (10 µM, 72 h, n=3). Las barras de error indican la desviación estándar (s.d.) de las réplicas. La Figura 8 es un gráfico que muestra experimentos paralelos como en la Figura 7 pero con células HFF que se enumeraron en el punto final (n=3). Las barras de error indican la desviación estándar (s.d.) de las réplicas.

NSC350625 indujo contenido por sub-G1 de una manera independiente de p53 y dependiente de Bax. La Figura 9 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de células HCT116 WT, p53^{-/-} y Bax^{-/-} después del tratamiento con DMSO, NSC350625 (1, 5 o 10 µM), o rhTRAIL (25 ng/ml) durante 72 h (n=3). Las barras de error indican la desviación estándar (s.d.) de las réplicas.

25 *P < 0,05 entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

Concordante con la muerte celular apoptótica, NSC350625 aumentó los niveles de caspasa activa-3 como se indica por el ensayo de inmunofluorescencia en células HCT116 p53^{-/-} tratadas con 5 µM de NSC350625 durante 72 horas y mediante análisis por transferencia de Western en células HCT116 p53^{-/-} tratadas con 1 µM, 2,5 µM, 5 µM o 10 µM de NSC350625 durante 72 h. La Figura 10 es una imagen que muestra los resultados del análisis por transferencia de Western. El contenido por sub-G1 inducido por NSC350625 se inhibió significativamente por la incubación conjunta con el inhibidor de la apoptosis pan-caspasa zVAD-fmk. La Figura 11 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de células cancerosas tratadas con NSC350625 preincubadas con o sin zVAD-fmk (10 µM, 72 h, n=3). Las barras de error indican la desviación estándar (s.d.) de las réplicas. *P < 0,05 entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

35 La apoptosis inducida por NSC350625 parece mediar específicamente por TRAIL, como se indica mediante la inhibición de la citotoxicidad inducida por NSC350625 después de la inactivación estable de TRAIL por ARNh_c. La Figura 12 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de células MDA-MB-231 con inactivación estable de TRAIL por ARN de horquilla corta (72 h, n=3). Las barras de error indican la desviación estándar (s.d.) de las réplicas. *P < 0,05 entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario. La Figura 13 es un gráfico que muestra la verificación de la inactivación de TRAILh_c en MDA-MB-231 mediante análisis de citometría de flujo de células tratadas con NSC350625 (5 µM, 72 h, n=3). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. *P < 0,05 entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

Se observó evidencia adicional para el requerimiento de TRAIL en la muerte de células tumorales inducida por NSC350625 después de la interrupción del dominio de muerte DR5 que modula la señalización de TRAIL proapoptótica.

La Figura 14 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de la muerte celular inducida por NSC350625 en células H460 con DR5 endógeno o sobreexpresión de un constructo de DR5 con su dominio de muerte reemplazado por EGFP (10 µM, 72 h, n=3). Las barras de error indican la desviación estándar (s.d.) de las réplicas. *P < 0,05 entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

50 El secuestro experimental de TRAIL mediante el uso de un anticuerpo de bloqueo mostró el requerimiento de TRAIL en la muerte de células tumorales inducida por NSC350625. La Figura 15 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de células HCT116 tratadas con DMSO, NSC350625 (10 µM) o rhTRAIL (25 ng/ml) en presencia o ausencia de un anticuerpo secuestrante de TRAIL, RIK-2 (72 h, n=3). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. *P < 0,05 entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

55 Se examinó la actividad de NSC350625 en células tumorales de colon recién reseadas de un paciente humano y se descubrió que NSC350625 inducía TRAIL y potentes efectos citotóxicos a diferencia del 5-FU. La Figura

16 es un gráfico que muestra el TRAIL en superficie inducido por NSC350625 en células de cáncer de colon recién resecadas (10 μ M, 72 h). El tejido era un adenocarcinoma mucinoso resecado de una paciente hembra de 85 años de edad. Los datos se expresan como mediana de intensidad de fluorescencia. La Figura 17 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de viabilidad celular de células de cáncer de colon primario de la Figura 16 tratados con DMSO, NSC350625 (0,6, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 μ M) o 5-FU (5 μ M) (n=3). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas.

La actividad citotóxica de NSC350625 es térmicamente estable a diferencia de TRAIL. La Figura 18 es un gráfico que muestra la capacidad de NSC350625 (5 μ M) o rhTRAIL (25 ng/ml) para reducir la viabilidad celular en células HCT116 después de una preincubación de 1 h a las temperaturas indicadas (72 horas, n=3). Las barras de error indican la desviación estándar (s.d.) de las réplicas.

NSC350625 es un potente agente antitumoral mediado por TRAIL *in vivo*

NSC350625 provocó regresión tumoral en el xenoinjerto de HCT116 p53^{-/-} en un grado comparable al observado con TRAIL cuando ambos se administraron como dosis múltiples. La Figura 19 es un gráfico que muestra el xenoinjerto de HCT116 p53^{-/-} tratado con 3 dosis de NSC350625 (i.p.), TRAIL (i.v.) o vehículo (i.p.) administrado en los días 0, 3 y 6, según lo indicado por las barras verticales grises (n=10). Las barras de error indican la desviación estándar (s.d.) de las réplicas. *P < 0,05 y **P < 0,005 entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

Experimentos de dosis única en ratones portadores de xenoinjertos de cáncer de colon humano RKO y HCT116 WT corroboraron la potente actividad antitumoral de NSC350625 y demostraron claramente la superioridad de TRAIL en el xenoinjerto de RKO en las condiciones dadas. La Figura 20 es un gráfico que muestra los resultados de la obtención de imágenes bioluminiscentes de xenoinjertos de HCT116 p53^{-/-} infectados con luciferasa que recibieron una inyección i.p. única de NSC350625 o vehículo (n=6). Las barras de error indican la desviación estándar (s.d.) de las réplicas. *P < 0,05 y **P < 0,005 entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

La Figura 21 es un gráfico que muestra el xenoinjerto de RKO con una dosis única de NSC350625 (i.p.), TRAIL (i.v.) o vehículo (i.p., n=10). Las barras de error indican la desviación estándar (s.d.) de las réplicas. *P < 0,05 y **P < 0,005 entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

NSC350625 indujo la regresión de los xenoinjertos de cáncer de mama humano MDA-MB-231, un efecto que se inhibió significativamente por la inactivación estable de TRAIL mientras que los tumores tratados con TRAIL progresaron. La Figura 22 es un diagrama de caja y bigotes del volumen tumoral el día 9 después del inicio del tratamiento en xenoinjertos de vector o TRAILhc en MDA-MB-231 con dosis únicas de NSC350625 (i.p.), TRAIL (i.v.) o vehículo (DMSO, i.p.) (n=8). Las barras de error indican la desviación estándar (s.d.) de las réplicas. *P < 0,05 y **P < 0,005 entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario. La tinción de TUNEL de tumores de los xenoinjertos de vector y TRAILhc en MDA-MB-231 2 días después del tratamiento con 50 mg/kg o 100 mg/kg NSC350625 muestran un aumento de la tinción de TUNEL en células no tratadas con TRAILhc tratadas con vector.

Esto demuestra directamente que la actividad antitumoral de NSC350625 es superior a la de TRAIL cuando se administra como dosis únicas en estas condiciones y se modula al menos en parte por TRAIL producido por las células tumorales. En los xenoinjertos de DLD-1, NSC350625 indujo estasis tumoral 1 semana posterior al tratamiento, mientras que los tumores tratados con TRAIL progresaron después de una dosis única. La Figura 23 es un gráfico que muestra el volumen tumoral relativo de xenoinjertos de DLD-1 tratados con TRAIL (i.v.), NSC350625 (i.p.) o DMSO (i.p.) como una dosis única en el día 0 a las concentraciones indicadas (n=8).

NSC350625 indujo, además, una regresión sostenida del xenoinjerto de SW480 como una dosis única por suministro intraperitoneal u oral, lo que sugiere una biodisponibilidad favorable. La Figura 24 es un gráfico que muestra la comparación de la administración i.p. frente a la administración oral de una dosis única de NSC350625 a 30 mg/kg en xenoinjertos de SW480 tratados el día 0 (n=6).

La titulación de una dosis única de NSC350625 administrado por vía oral en el modelo de xenoinjerto de HCT116 reveló una eficacia antitumoral sostenida a 25 mg/kg. La Figura 25 es un gráfico que muestra NSC350625 o vehículo administrado como una dosis oral única en el xenoinjerto de HCT116 (n=6). Las barras de error indican la desviación estándar (s.d.) de las réplicas. *P < 0,05 y **P < 0,005 entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

La ausencia de toxicidad aparente en dosis múltiples administradas 4 veces por encima de esta dosis terapéutica en un xenoinjerto previo junto con ningún efecto adverso sobre el peso corporal o la histología hepática sugiere que NSC350625 tiene una amplia ventana terapéutica. La Figura 26 es un gráfico que muestra el peso corporal de ratones atímicos hembras desnudos tratados con una dosis única de NSC350625 (100 mg/kg, i.p.). La Figura 27 es un gráfico que muestra el peso corporal de ratones hembras C57B6 al final de la semana 4 de tratamiento con una dosis semanal única de NSC350625 oral (25 mg/kg) durante 4 semanas. El análisis histológico mediante tinción con H-E del hígado de ratones atímicos hembras desnudos cosechados 3

días después del tratamiento con NSC350625 (100 mg/kg, i.p.) no mostró toxicidad aparente de NSC350625.

La exposición crónica a NSC350625 oral a 25 mg/kg por semana durante 4 semanas en ratones inmunocompetentes no provocó ningún cambio en un panel de marcadores de química sérica como se muestra en las Tablas IA y IB.

- 5 Las Tablas IA e IB muestran la química sérica de ratones C57B6 tratados con vehículo o NSC350625 (25 mg/kg) semanalmente durante 4 semanas.

Tabla IA

Cohorte	Sodio (mM)	Potasio (mM)	Cloruro (mM)	Bilirrubina total (mg/dl)	Nitrógeno ureico en sangre (mg/dl)
Control	151,5±4,2	9,025±2,2	106,75±1,7	3,075±1,6	26±1,6
NSC350625	154,5±5,2	7,325±3,2	104	2,725±2,4	33,75±7,3

Tabla IB

Cohorte	Creatinina (mg/dl)	Proteína total (g/dl)	Albumina (g/dl)	Fosfato alcalina (U/l)	Lactato deshidrogenasa (U/l)
Control	0,25±0,06	4,9±0,36	3±0,08	104.5	265
NSC350625	0,15±0,06	4,97±0,61	2.9	112±12	287,5±125

- 10 Para probar la eficacia de NSC350625 en un modelo de cáncer preclínico inmunocompetente, se usaron ratones transgénicos Eμ-Myc que desarrollan linfoma espontáneamente. Se usó el mismo programa de dosificación oral como anteriormente que se demostró que era seguro desde las semanas 9-12 de edad. NSC350625 prolongó significativamente la supervivencia de estos ratones por 4 semanas. La Figura 28 es un gráfico que muestra la supervivencia general de Eμ-myc tratados durante las semanas 9-12 con NSC350625 oral semanalmente (25 mg/kg). El valor de P se determinó por la prueba de rango logarítmico. Para las gráficas de volumen tumoral relativo, el tamaño del tumor se expresa con respecto al tamaño del tumor en el día 0, que se define como el día de inicio del tratamiento. El análisis histológico mediante tinción H-E de los ganglios linfáticos axilares de Eμ-myc y C57B6 WT a las 14 semanas de edad no mostró toxicidad aparente de NSC350625.

Combinaciones sinérgicas de NSC350625 y agentes quimioterapéuticos

- 20 Sorprendentemente, se observa sinergia *in vitro* entre NSC350625 y los taxanos paclitaxel y docetaxel (nombre comercial Taxotere). La Figura 29 es un gráfico que muestra la viabilidad celular de células DLD-1 tratadas con NSC350625 en combinación con paclitaxel en las condiciones indicadas (72 h, n=3). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. La Figura 30 es un gráfico que muestra la viabilidad celular de células SW620 tratadas con NSC350625 en combinación con paclitaxel en las condiciones indicadas (72 h, n=3). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. La Figura 31 es un gráfico que muestra la viabilidad celular de células DLD-1 tratadas con NSC350625 en combinación con taxotere en las condiciones indicadas (72 h, n=3). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. La Figura 32 es un gráfico que muestra la viabilidad celular de células SW620 tratadas con NSC350625 en combinación con taxotere en las condiciones indicadas (72 h, n=3). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas.

- 30 La combinación de NSC350625 y cualquiera de los taxanos paclitaxel o docetaxel cooperó para producir curas sostenidas en el xenoinjerto de cáncer de pulmón de células no pequeñas H460. La Figura 33 es un gráfico que muestra el por ciento de cohortes en xenoinjerto de H460 que retienen la carga tumoral después del tratamiento con NSC350625 (30 mg/kg, i.p.) o taxotere (20 mg/kg, i.v.) solo, en combinación o con vehículo (DMSO, i.p.) (n=8) como dosis únicas. La Figura 34 es un gráfico que muestra el trazado del volumen tumoral relativo para la Figura 33. Las barras de error indican la s.d. de las réplicas.

- 35 La Figura 35 es un gráfico que muestra el por ciento de cohortes en xenoinjerto de H460 que retienen la carga tumoral después del tratamiento con NSC350625 (30 mg/kg, i.p.) o paclitaxel (20 mg/kg, i.v.) solo, en combinación o con vehículo (DMSO, i.p.) (n=8) como dosis únicas. La Figura 36 es un gráfico que muestra un gráfico de volumen tumoral relativo para la Figura 35. Las barras de error indican la s.d. de las réplicas.

En este ejemplo, se encontró que NSC350625 cooperaba con bevacizumab cuando ambos se administraron

una vez por semana en un modelo de ratón ortotópico metastásico de cáncer colorrectal deficiente en p53 para reducir la incidencia de tumores en el tumor cecal primario y sitios metastásicos distales, lo que incluye pulmón, hígado, ganglios linfáticos y peritoneo. La Figura 37 es un gráfico que muestra el por ciento de cohortes implantadas con tumores HCT116 p53^{-/-} intracecales con tumores evidentes en los sitios primario y distales en el punto final (n=5). Según lo indicado por la línea de tiempo, el tratamiento se administró una vez por semana a partir de las 2 semanas posteriores a la implantación con cohortes que recibieron vehículo, NSC350625 (25 mg/kg, oral), bevacizumab (bev, 10 mg/kg, i.v.), o la combinación de NSC350625 y bevacizumab.

NSC350625 solo y en combinación con bevacizumab se toleró bien y no provocó cambios significativos en el peso corporal en el punto final con este régimen multidosis. La Figura 38 es un gráfico que muestra el peso corporal de los ratones en el punto final. Las barras de error indican la s.d. de las réplicas.

NSC350625 provoca la muerte celular específica del tumor por los efectos directos e inespecíficos mediados por TRAIL

El análisis inmunohistoquímico (IHC) de tumores de xenoinjerto de HCT116 p53^{-/-} después de una dosis única de NSC350625 en el día 0 (100 mg/kg, i.p.) reveló niveles de proteína aumentados de TRAIL y caspasa-8 escindida, la caspasa iniciadora involucrada en la apoptosis mediada por TRAIL.

Los núcleos fragmentados observados por histología y el aumento de la tinción de TUNEL (marcage de final de corte de dUTP mediado por TdT) confirmaron posteriormente que NSC350625 indujo apoptosis en los tumores tratados. Además, NSC350625 no solo indujo TRAIL en el tumor sino también en fibroblastos estromales que bordean el tumor, como se muestra en el análisis de H-E e IHC para TRAIL en el borde del tumor y fibroblastos estromales de tumores de xenoinjerto de HCT116 p53^{-/-} después del tratamiento con NSC350625 (100 mg/kg, i.p.) o vehículo el día 2 después del tratamiento.

Al observar la expresión de TRAIL inducida por NSC350625 en fibroblastos, se analizó el TRAIL soluble en ratones no portadores de tumor tratados con NSC350625 para determinar si las células normales secretan TRAIL en respuesta a NSC350625. NSC350625 eleva rápidamente los niveles séricos de TRAIL de una manera que dura más de 72 horas, más que la vida media en suero de TRAIL recombinante (~30 minutos). La Figura 39 es un gráfico que muestra los niveles séricos de TRAIL en ratones libres de tumor después de NSC350625 (100 mg/kg, i.v.) o doxorrubicina (30 mg/kg, i.p.) (n=2). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas.

El TRAIL sérico inducido por NSC350625 se detectó tan pronto como 2 horas después de la administración, que es más rápido que la cinética observada *in vitro* en los ejemplos descritos en la presente memoria. El análisis farmacocinético reveló que NSC350625 se distribuye rápidamente y tiene una vida media plasmática de ~6,5 horas. La Tabla II muestra los resultados del análisis farmacocinético de NSC350625 en plasma de ratones C57B6. La Figura 40 es un gráfico que muestra el perfil de absorbancia de NSC350625 con un pico de absorbancia a 239 nm. La Figura 41 es un gráfico que muestra una curva de calibración para NSC350625 añadido al plasma de ratón y cuantificado por análisis de HPLC

25 mediante el uso del área bajo la curva (AUC). La Figura 42 es un gráfico que muestra las concentraciones plasmáticas de NSC350625 después de la administración intravenosa a 25 mg/kg en ratones hembras C57B6 (n=3). Las barras de error representan la media del error estándar de las réplicas.

Tabla II											
Dosis (mg/kg)	t _{máx} (h)	C _{máx} (µM)	A(h)	B(h)	α(1/h)	β(1/h)	t _{1/2α} (h)	t _{1/2β} (h)	AUC _{0-∞} (µM·h)	CL (l/h/kg)	Vd (l/kg)
25	0,02	44,2	44,6	7,67	14,9	0,108	0,047	6,42	63,9	1,01	9,39

NSC350625 tiene una vida media más larga que el TRAIL recombinante y que los efectos de NSC350625, es decir, la inducción de TRAIL, se mantienen temporalmente durante días *in vivo* como se vio *in vitro*.

El análisis por IHC de tejidos normales en ratones atímicos desnudos no portadores de tumor después de la administración de NSC350625 el día 0 (100 mg/kg, i.v.) reveló que TRAIL se regula positivamente al nivel de proteína en el cerebro, riñón y bazo de ratones sin toxicidad aparente según lo determinado por la histología y la tinción de TUNEL. La regulación positiva de TRAIL en respuesta a NSC350625 no se observó en otros tejidos, lo que incluye el hígado, en ningún punto temporal.

Los efectos de NSC350625 sobre fibroblastos normales y su selectividad para las células normales se probaron en este ejemplo. NSC350625 indujo selectivamente apoptosis en células tumorales con deficiencia de p53 pero no fibroblastos normales en experimentos de cocultivo, mediante el uso de células HCT116 p53^{-/-} y HFF tratadas con NSC350625 (10 µM) o DMSO durante 3 días.

NSC350625 induce una cantidad significativa aunque modesta de TRAIL en la superficie de los fibroblastos normales.

La Figura 43 es un gráfico que muestra el análisis de TRAIL en superficie de células HFF después del tratamiento con NSC350625 (0, 2,5, 5 o 10 μM de izquierda a derecha) (72 h, n=3). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. * $P < 0,05$ entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

Para probar si las células normales contribuyen a la eficacia antitumoral de NSC350625 a través de un efecto inespecífico mediado por TRAIL, se trasplantaron fibroblastos normales preincubados con NSC350625 en cocultivo con células de cáncer de colon deficientes en p53. Esto resultó en un aumento modesto pero significativo en la muerte celular específica de TRAIL de la subpoblación de células cancerosas. La Figura 44 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de un cocultivo de células HCT116 p53^{-/-} y HFF pretratadas (24 h, n=3). El pretratamiento de HFF consistió en una incubación de 72 horas con NSC350625 (10 μM) o DMSO. Estos experimentos se realizaron en presencia o ausencia de un anticuerpo secuestrante de TRAIL (RIK-2). Las barras de escala son de 100 μm . Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. * $P < 0,05$ entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

Por lo tanto, como se demuestra en la presente memoria, NSC350625 tiene un índice terapéutico favorable e induce TRAIL en células tumorales, estromales y normales que puede contribuir a la eficacia antitumoral de NSC350625 a través de mecanismos directos e inespecíficos.

NSC350625 es un agente antitumoral eficaz en el glioblastoma multiforme (GBM)

NSC350625 induce TRAIL en el cerebro y es útil como agente antitumoral contra tumores cerebrales. La actividad de NSC350625 en líneas celulares GBM se probó en este ejemplo y se descubrió que NSC350625 induce TRAIL y tenía una GI50 independiente de p53 en el rango micromolar bajo que es comparable con otras líneas de células cancerosas. La Figura 45 es un gráfico que muestra TRAIL en superficie en líneas celulares GBM después de la incubación con NSC350625 (5 μM , 72 h, n=3). * $P < 0,05$ entre la condición indicada y el control. La Figura 46 es un gráfico que muestra los valores de GI50 extrapolados de los ensayos de viabilidad celular de líneas celulares GBM indicadas a las 72 horas después del tratamiento con NSC350625 o DMSO (n=3).

NSC350625 tiene efectos citotóxicos en células GBM recién aisladas que eran resistentes a la temozolomida y se irradiaron previamente en este ejemplo. La Figura 47 muestra los resultados de un ensayo de viabilidad celular de tejido de glioblastoma recién resecado tratado con DMSO, NSC350625 o temozolomida (TMZ, 10 μM) (72 h, n=3). El tejido era un glioblastoma de grado IV con componente oligodendroglial tomado de un paciente hembra de 38 años que se había sometido a cirugía citoreductora previa y radiación.

NSC350625 se probó en modelos preclínicos de GBM como un monoagente y en combinación con bevacizumab. NSC350625 ejerció citotoxicidad independiente de p53 contra un panel de líneas celulares GBM, lo que incluye las líneas celulares GBM resistentes a temozolomida tales como T98G, e indujo una regresión sostenida de xenoinjertos subcutáneos de T98G en un grado similar al bevacizumab cuando se administró como una dosis oral única. La Figura 48 es un gráfico que muestra el xenoinjerto subcutáneo de T98G con ratones que reciben una dosis única de vehículo, NSC350625 (30 mg/kg, PO) o bevacizumab (10 mg/kg, i.v.) el día 0 (n=8). * $P < 0,05$ entre la condición indicada y el control.

Una dosis única de NSC350625 duplicó significativamente la supervivencia general de los ratones como un monoagente en un xenoinjerto intracraneal agresivo de GBM humano mediante el uso de la línea celular SF767 y cooperó con bevacizumab para triplicar la duración de la supervivencia de dichos ratones que portan tumor cerebral.

La Figura 49 es un gráfico que muestra la supervivencia general de ratones que albergan tumores intracraneales SF767 tratados con una dosis oral única de vehículo (n=8), NSC350625 (25 mg/kg, n=7), bevacizumab (10 mg/kg, i.v., n=6), o NSC350625 y bevacizumab (n=7) a las 2 semanas posteriores a la implantación.

La Tabla III muestra el cambio en la supervivencia general de las cohortes de ratones con tumores intracraneales SF767.

Tabla III				
Cohorte	n	Mediana de supervivencia (días)	Δ Mediana de supervivencia (días)	P
Control	8	28	-	-
NSC350625	7	74	46	0,038

bev	6	70	42	0,119
NSC350625 + bev	7	96,5	68,5	0,0308

La regulación positiva de TRAIL inducida por NSC350625 es dependiente de Foxo3a

Para identificar los eventos moleculares que sustentan la regulación positiva inducida por NSC350625 de TRAIL, se determinaron los perfiles de expresión génica en células HCT116 p53^{-/-} tratadas con NSC350625. Se observaron cambios transcripcionales en los genes objetivo de la familia FOXO de factores de transcripción, que incluye Foxo3a que se ha demostrado previamente que regula el promotor del gen de TRAIL en un sitio de unión contenido dentro de la región seleccionada como se describe en Modur, V. y otros, 2002, J. Biol. Chem. 277:47928-47937. La Figura 50 es un gráfico que muestra los cambios transcripcionales asociados con la señalización por FOXO del perfil de expresión génica de células HCT116 p53^{-/-} a las 48 horas después del tratamiento con NSC350625 (10 μ M) frente a DMSO (n=3). Todos estos cambios fueron $P < 0,05$ entre los grupos de tratamiento DMSO y NSC350625. Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. * $P < 0,05$ entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

El gen objetivo FOXO-DR5 se reguló positivamente por NSC350625 en varias líneas de células cancerosas y en un grado mucho menor en células normales y esto también se observó en tumores tratados con NSC350625. La Figura 51 es una imagen del análisis por transferencia de Western de DR5 en células HCT116 tratadas con NSC350625 o DMSO a las concentraciones indicadas durante 72 h. Ran se muestra como un control de carga. La Figura 52 es un gráfico que muestra el análisis por citometría de flujo de los niveles de DR5 en superficie en células cancerosas y normales tratadas con NSC350625 (72 h, n=3). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. * $P < 0,05$ entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

El análisis por IHC de DR5 en tumores de xenoinjerto de HCT116 tratados con vehículo (i.p.) o NSC350625 (100 mg/kg, i.p.) muestra, de acuerdo con las observaciones in vitro, que la expresión elevada de DR5 era evidente en tumores de xenoinjerto tratados con NSC350625.

Miembros de la familia FOXO, Foxo3a (pero no Foxo1) experimentaron una translocación nuclear en respuesta a NSC350625 según lo determinado por inmunofluorescencia y análisis por transferencia de Western de Foxo3a en células HCT116 y análisis de inmunofluorescencia de Foxo3a en células H460 y SW480 tratadas con DMSO o NSC350625, 10 μ M, 48 h.

La Figura 53 es una imagen del análisis por transferencia de Western de lisados de células enteras (W) y extractos citoplasmáticos (C) y nucleares (N) de células HCT116 tratadas con DMSO o NSC350625 (48 h, 10 μ M). La β -actina y la lámina B1 se muestran como controles de carga citoplasmática y nuclear, respectivamente.

Se encontró un aumento dependiente de la dosis de NSC350625 en la cantidad de Foxo3a localizada hacia el promotor TRAIL como se muestra por el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina. La Figura 54 es una imagen de los resultados de un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina para la translocación inducida por NSC350625 de Foxo3a hacia el promotor TRAIL a las 48 horas después del tratamiento con NSC350625 en células HCT116 p53^{-/-} (0, 2,5, 5 o 10 μ M de izquierda a derecha).

La inactivación transitoria de Foxo3a y Foxo1 reveló que Foxo3a mediaba específicamente la regulación positiva de TRAIL inducida por NSC350625. La Figura 55 es un gráfico que muestra los resultados del análisis por citometría de flujo de los niveles de TRAIL en la superficie celular inducidos por NSC350625 (10 μ M) con o sin inactivación transitoria de Foxo1 y/o Foxo3a en células HCT116 p53^{-/-} mediante el uso de ARNip (72 h, n=3). La inactivación se confirma mediante análisis por transferencia de Western. Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. * $P < 0,05$ entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

La inactivación estable de Foxo3a inhibió significativamente la regulación positiva inducida por NSC350625 de la producción de TRAIL y la posterior muerte de las células tumorales. La Figura 56 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de la muerte celular inducida por NSC350625 con o sin inactivación estable de Foxo3a en células HCT116 (10 μ M, 72 h, n=3). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. * $P < 0,05$ entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario. La Figura 57 es un gráfico que muestra el análisis por citometría de flujo de TRAIL en superficie inducido por NSC350625 con o sin inactivación estable de Foxo3a en células HCT116 (10 μ M, 72 h, n=3). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. * $P < 0,05$ entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario. Los resultados de la inactivación estable de Foxo3a se confirmaron mediante análisis por transferencia de Western.

La inactivación estable de Foxo3a en las células tumorales también inhibió significativamente la actividad antitumoral de NSC350625 y los signos característicos inducidos por NSC350625 de la apoptosis mediada por

TRAIL en tumores *in vivo*. La Figura 58 es un gráfico que muestra el volumen tumoral del xenoinjerto de HCT116 con o sin inactivación estable de Foxo3a después de una dosis oral única de vehículo o NSC350625 (25 mg/kg) el día 0 (n=10). Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. * $P < 0,05$ entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

- 5 Se realizó un análisis por IHC y la tinción de TUNEL de tumores HCT116 con o sin inactivación estable de Foxo3a 3 días después de una dosis única de NSC350625 (25 mg/kg, oral) y mostró que la inactivación estable de Foxo3a en células tumorales también inhibió significativamente la actividad antitumoral de NSC350625 y los rasgos inducidos por NSC350625 de la apoptosis mediada por TRAIL en tumores *in vivo*.

La inactivación dual de Akt y ERK por NSC350625 induce cooperativamente TRAIL

- 10 Se determinaron los cambios inducidos por NSC350625 en los reguladores de Foxo3a tales como IKK, Akt y ERK. La Figura 59 es una imagen del análisis por transferencia de Western de células HCT116 p53^{-/-} tratadas con NSC350625 (2,5, 5, 10 μ M) durante 72 h.

- Se descubrió que tanto los niveles de pAkt como de pERK se abolían con el tratamiento con NSC350625 de una manera dependiente de la dosis que se acompañaba de la desfosforilación de sus respectivos sitios de fosforilación en Foxo3a. Un análisis de curso de tiempo reveló que la inactivación inducida por NSC350625 de Akt y ERK se produjo después de 48 horas, cinética que se combinó con la desfosforilación de Foxo3a y la regulación positiva de TRAIL. La Figura 60 es una imagen del análisis por transferencia de Western de células HCT116 p53^{-/-} tratadas con NSC350625 (10 μ M) durante los períodos de tiempo indicados. La Figura 61 es un gráfico que muestra el curso temporal de los niveles de expresión de proteínas de los efectos inducidos por NSC350625 determinados por densitometría de transferencias de Western de experimentos replicados como en la Figura 60 (n=3). Los datos se expresan con respecto a la muestra control para cada punto temporal y se normalizaron con respecto a Ran. El TRAIL se cuantificó por citometría de flujo como un experimento paralelo (n=3).

- 25 Estos efectos inducidos por NSC350625 sobre Foxo3a fueron evidentes en varias líneas de células cancerosas de diferentes tipos de tumores, que incluyen líneas de células cancerosas humanas con diversos antecedentes genéticos

- que albergan alteraciones oncogénicas en p53, KRAS, PTEN y otros. La Figura 62 es una imagen del análisis por transferencia de Western de los efectos inducidos por NSC350625 sobre Foxo3a en células de cáncer de colon humano DLD1, células de cáncer de mama humano MDA-MB-468 y líneas celulares multiformes de glioblastoma humano T98G (10 μ M, 72 h).

- Se encuentra que Akt es un determinante de la sensibilidad citotóxica a NSC350625 y su regulación positiva de TRAIL, y la hiperactivación de Akt puede suprimir incluso los niveles basales de TRAIL, como se muestra en el análisis de inmunofluorescencia de Foxo3a en células HCT116 que sobreexpresan un vector vacío o Akt miristilado (myr-Akt) con tratamiento con NSC350625 (10 μ M, 48 h). La confirmación de la sobreexpresión de myr-Akt por análisis de transferencia de Western se muestra en la Figura 63. La Figura 64 es un gráfico que muestra el análisis por citometría de flujo de TRAIL en superficie en células HCT116 que sobreexpresan un vector vacío o Akt miristilado (myr-Akt) con tratamiento con NSC350625 (10 μ M, 48 h). La Figura 65 es un gráfico que muestra el contenido por sub-G1 de células HCT116 que sobreexpresan un vector vacío o myr-Akt con tratamiento con NSC350625 (10 μ M, 72 h, n=3).

- 40 La doble inhibición de las rutas Akt y MAPK conducirá de manera cooperativa a la translocación nuclear de Foxo3a y la consiguiente regulación positiva de TRAIL. A6730 y monoetanolato de U0126 están disponibles comercialmente e inhibidores previamente descritos de Akt/2, Desplat, V. y otros, 2008, J. Enz. Inhib. Med.Chem., 23: 648-658, y MEK, Favata, M. F., y otros, 1998, J. Biol. Chem., 273:18623-18632, respectivamente, usados en este ejemplo para determinar si la doble inhibición de las rutas de Akt y MAPK conducirá de manera cooperativa a la translocación nuclear de Foxo3a y la consiguiente regulación positiva de TRAIL. Se encontró que la combinación de inhibidores de MEK y Akt induce cooperativamente la regulación positiva de TRAIL dependiente de Foxo3a y la muerte celular mediada por TRAIL sinérgicamente. La Figura 66 es un gráfico que muestra el análisis por RT-qPCR de ARNm de TRAIL en células HCT116 p53^{-/-} después de la incubación con A6730 10 μ M (inh de Akt), monoetanolato de U0126 (inh de MEK), o ambos (48 h, n=3). Para inh de Akt + MEK, $P < 0,05$ en comparación con todas las demás condiciones. * $P < 0,05$ entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

La Figura 67 es un gráfico que muestra la inducción de TRAIL en superficie como en la Figura 66 con o sin inactivación estable de Foxo3a (n=3). * $P < 0,05$ entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario.

- 55 La Figura 68 es un gráfico que muestra el análisis por sub-G1 de MDA-MB-231 con o sin inactivación de TRAIL por ARNh después de la incubación con 10 μ M de inh de Akt, inh de MEK, o ambos durante 48 h (n=3). * $P < 0,05$ entre la condición indicada y el control a menos que se indique lo contrario. La Figura 69 es un gráfico que muestra el análisis de TRAIL en superficie de células HCT116 p53^{-/-} después de la incubación con A6730 10

μ M (inh de Akt), monoetanolato de U0126 (inh de MEK), o ambos (48 h, n=3).

5 Los experimentos con ARNip en este ejemplo muestran que ERK y Akt pueden inhibirse para regular positivamente de forma cooperativa TRAIL. La Figura 70 es un gráfico que muestra el análisis por RT-qPCR de los niveles de ARNm de TRAIL después de la inactivación transitoria de Akt y/o ERK en células HCT116 p53^{-/-} a las 48 horas posteriores a la inactivación (n=3). Para la combinación de ERKip y Aktip, P < 0,05 en comparación con todas las demás condiciones.

10 La Figura 71 es una imagen que muestra la confirmación de la inactivación de Akt y ERK mediante análisis por transferencia de Western. Las barras de error indican la s.d. de las réplicas. La Figura 72 es un gráfico que muestra el análisis de TRAIL en superficie después de la inactivación transitoria de Akt y/o ERK en células HCT116 a las 48 horas posteriores a la inactivación (n=3).

NSC350625 provoca una doble inactivación de Akt y ERK, lo que conduce cooperativamente a la translocación nuclear de su sustrato mutuo Foxo3a que induce transcripcionalmente el gen de TRAIL como un gen objetivo único para potenciar la muerte celular y los potentes efectos antitumorales in vivo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto NSC350625, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento de cáncer del sistema nervioso central, cáncer de pulmón de células no pequeñas o linfoma en un sujeto.
- 5 2. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el método es un tratamiento de un cáncer del CNS seleccionado del grupo que consiste en gliomas, meningiomas, adenomas hipofisarios, tumores de la vaina nerviosa y oligodendrogliomas.
3. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el método comprende además la administración de un segundo agente terapéutico al sujeto.
- 10 4. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3, en la que el segundo agente terapéutico comprende un agente anticanceroso.
5. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 4, en la que el agente anticanceroso es un inhibidor mitótico.
- 15 6. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 4, en la que el agente anticanceroso es paclitaxel, docetaxel o una combinación de los mismos.
7. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 3, en la que el segundo agente terapéutico comprende un agente antiangiogénico.
8. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 7, en la que el agente antiangiogénico es bevacizumab.
- 20 9. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición se administra por vía oral.
10. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición se administra por vía rectal, nasal, pulmonar, epidural, ocular, ótica, intraarterial, intracardíaca, intracerebroventricular, intradérmica, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraósea, intratecal, intravesical, subcutánea, tópica, transdérmica, transmucosa, sublingual, bucal, vaginal o inhalatoria.
- 25 11. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el método comprende además evaluar la eficacia del tratamiento, en el que evaluar la eficacia del tratamiento comprende analizar el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF en una muestra biológica obtenida del sujeto.
12. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, en la que la muestra biológica es sangre, suero, plasma o líquido cefalorraquídeo.
- 30

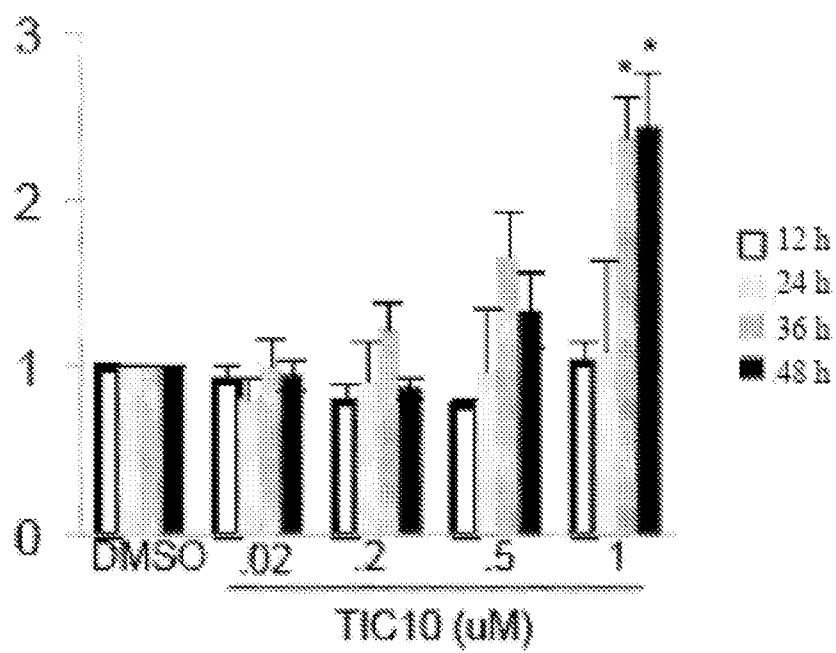


FIGURA 1

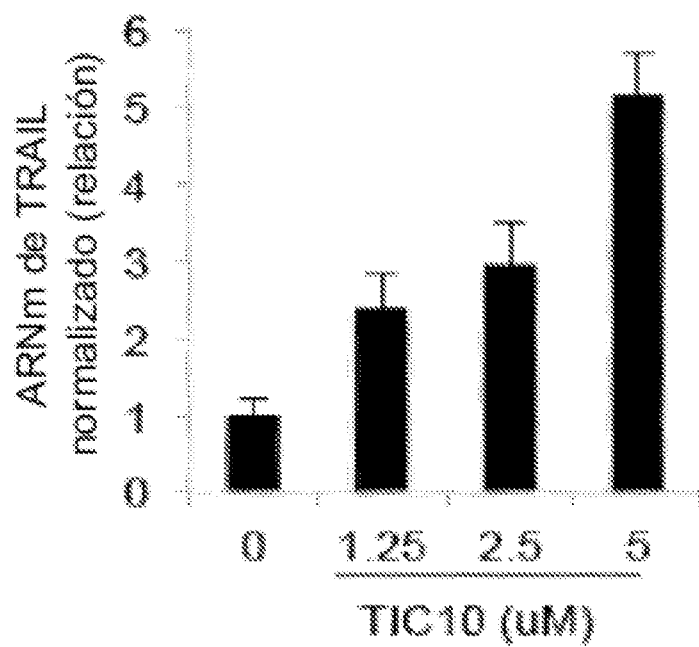


FIGURA 2

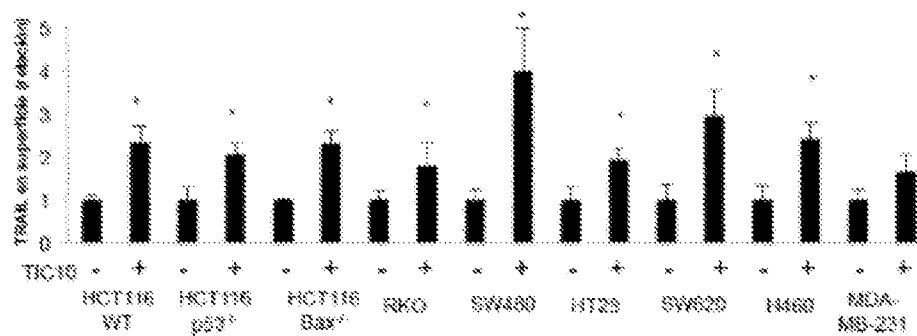


FIGURA 3

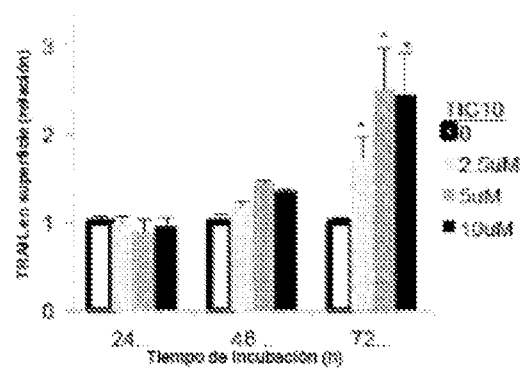


FIGURA 4

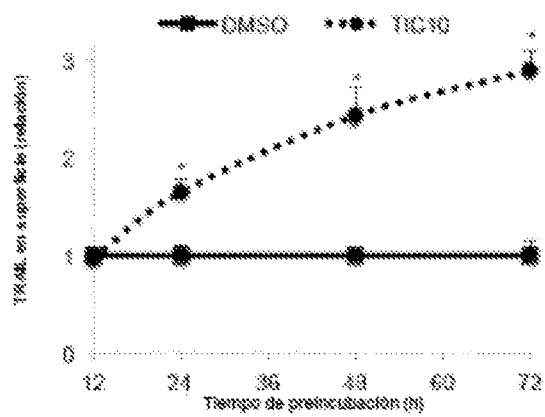


FIGURA 5

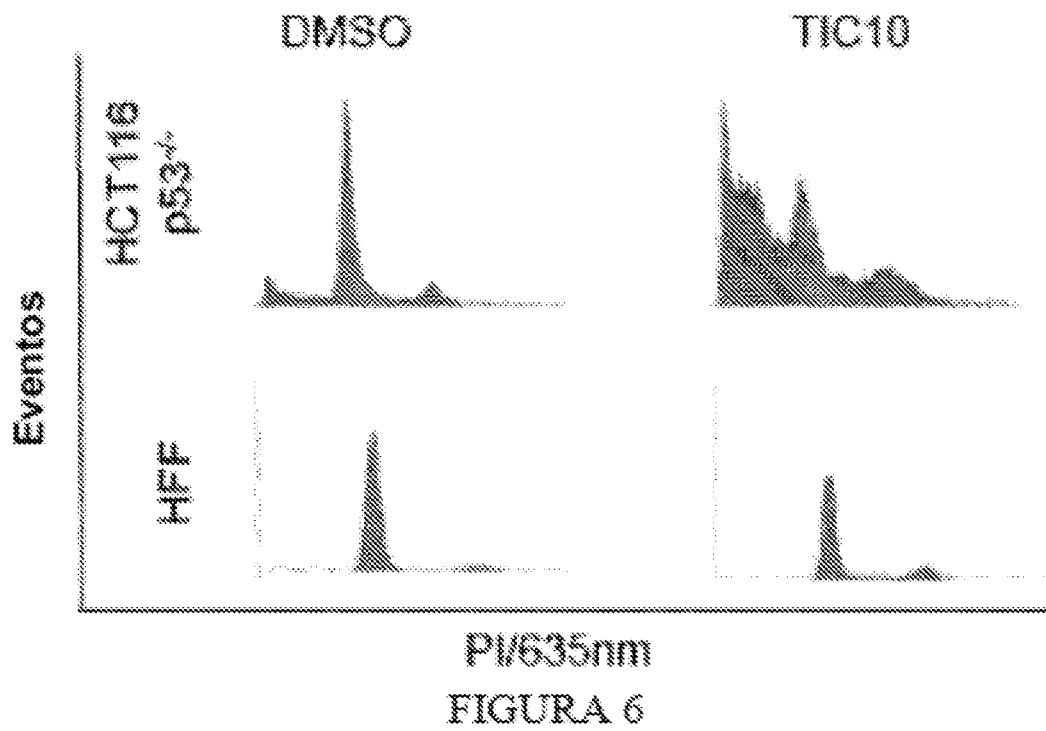


FIGURA 6

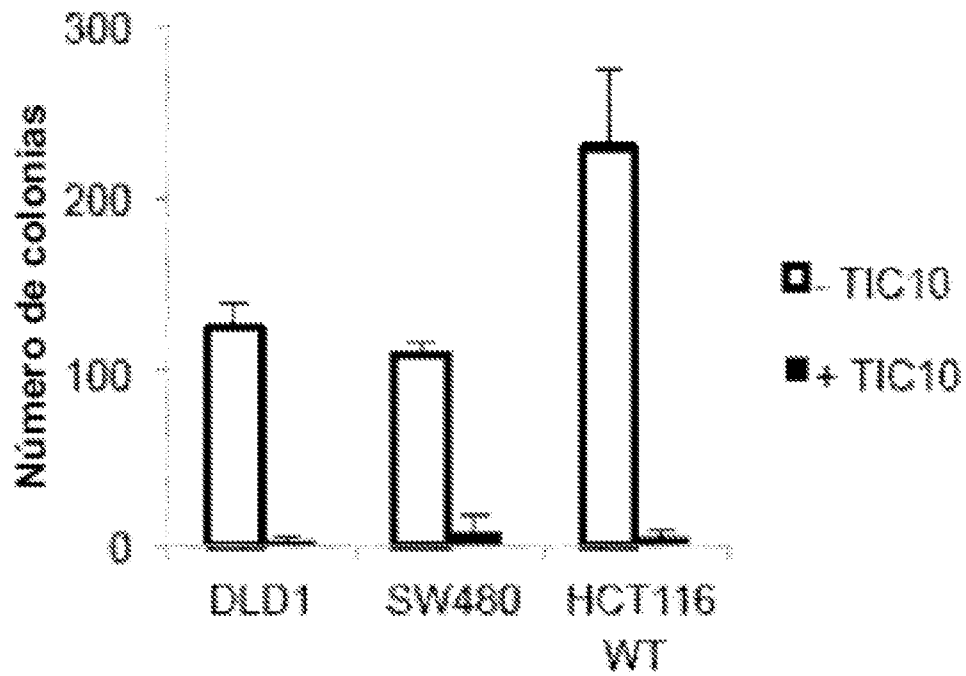
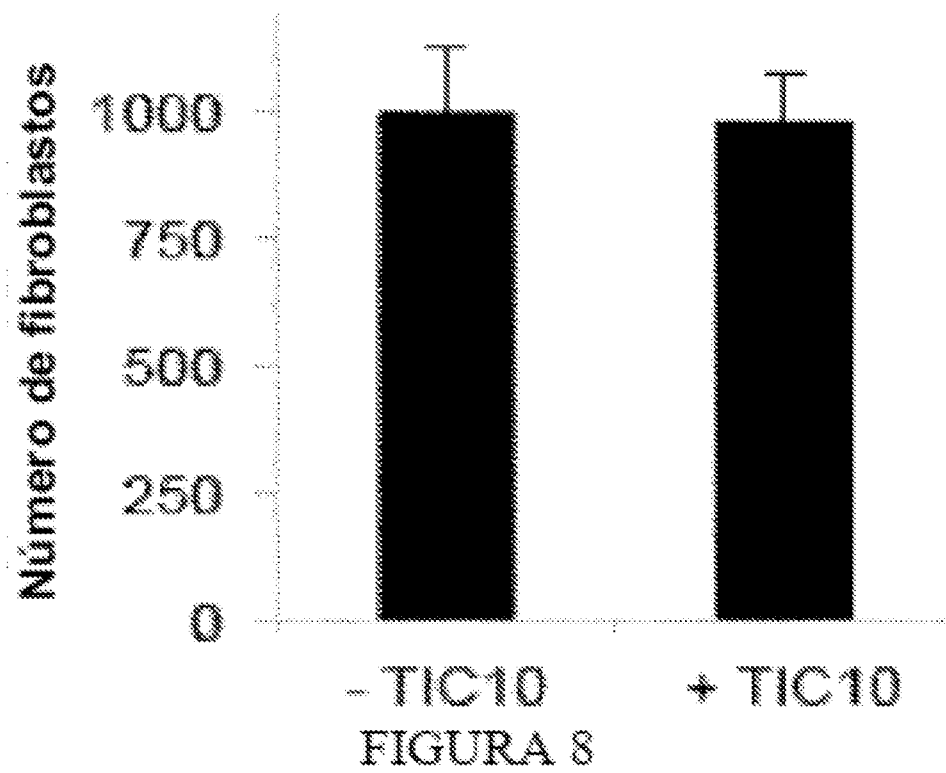


FIGURA 7



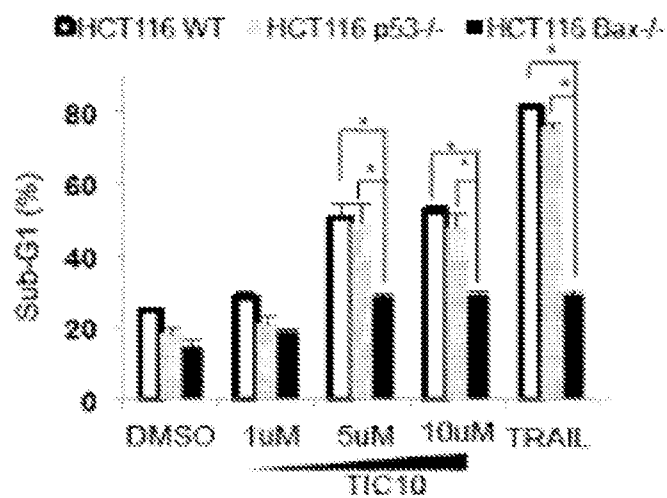


FIGURA 9

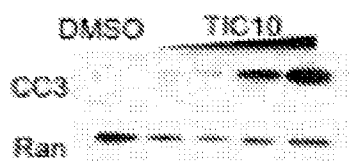


FIGURA 10

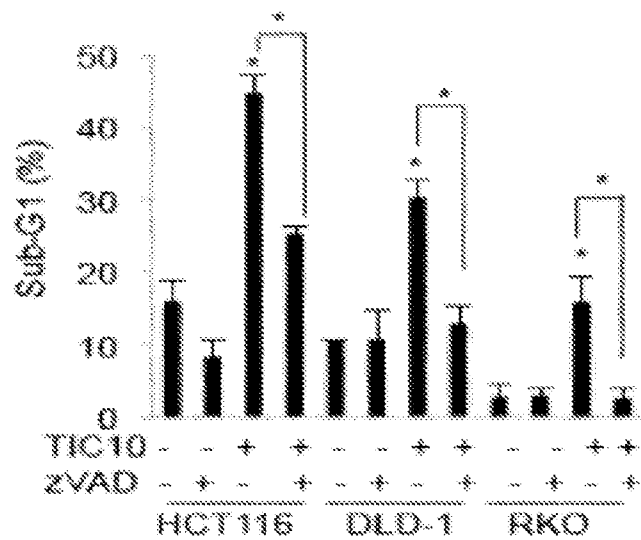


FIGURA 11

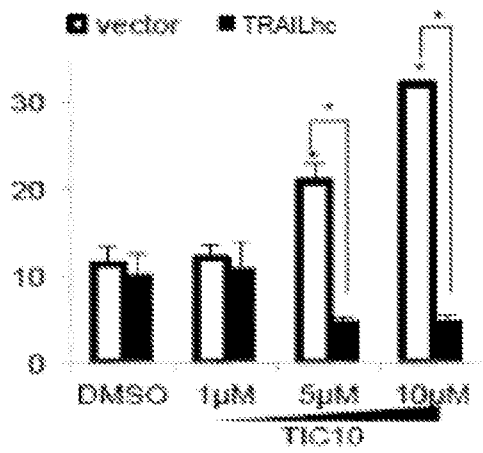


FIGURA 12

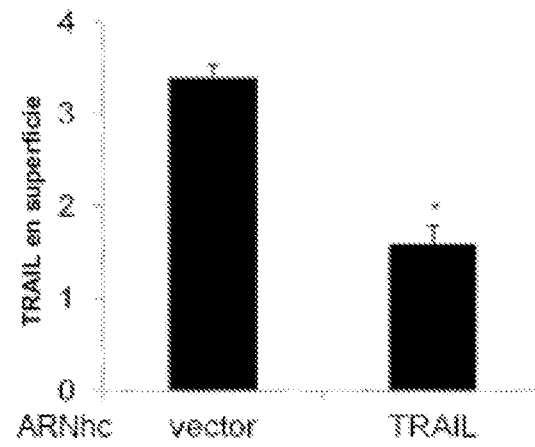


FIGURA 13

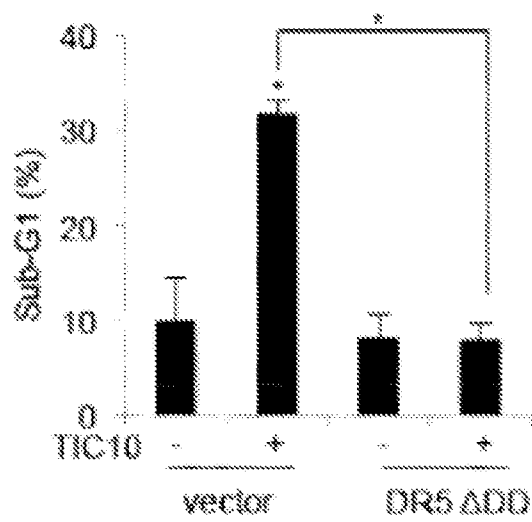


FIGURA 14

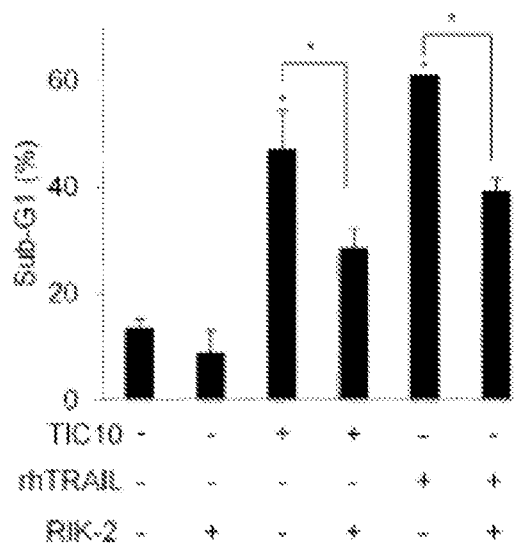


FIGURA 15

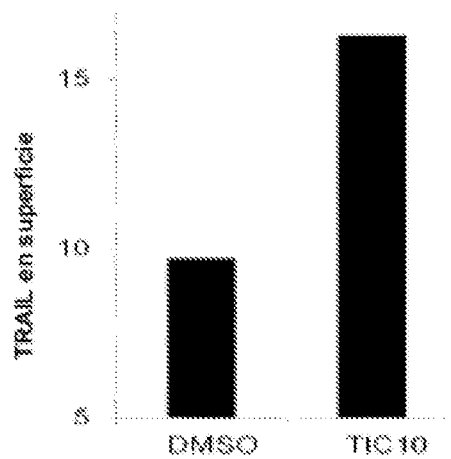


FIGURA 16

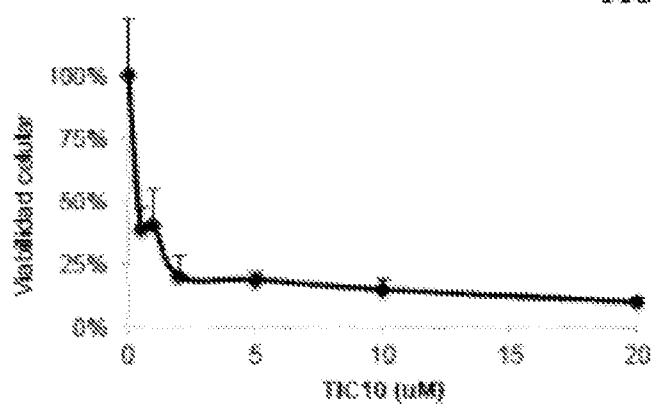


FIGURA 17

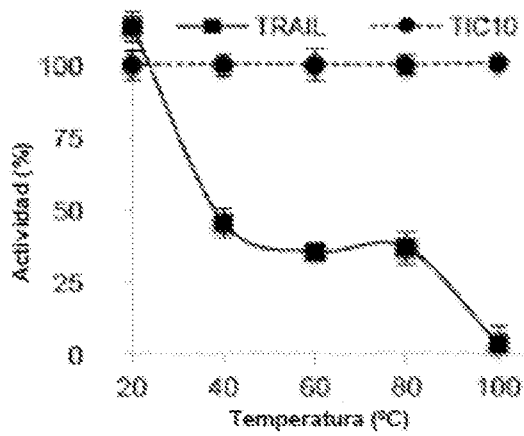


FIGURA 18

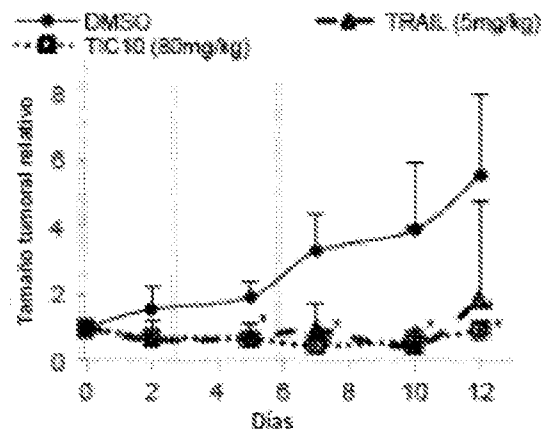


FIGURA 19

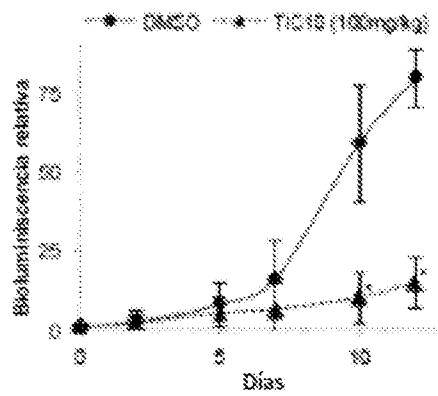


FIGURA 20

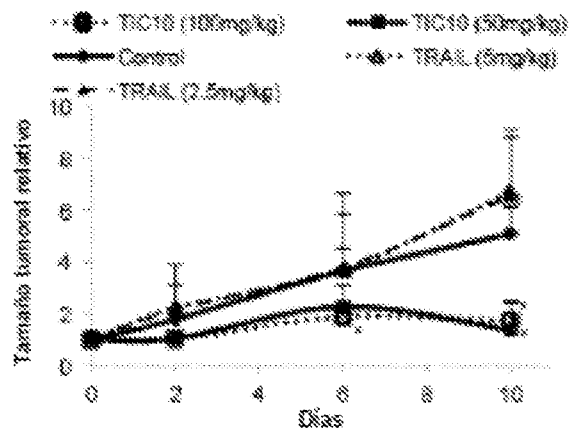


FIGURA 21

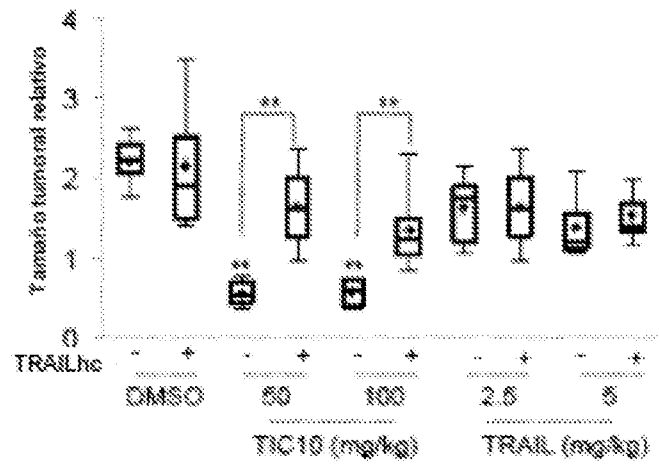


FIGURA 22

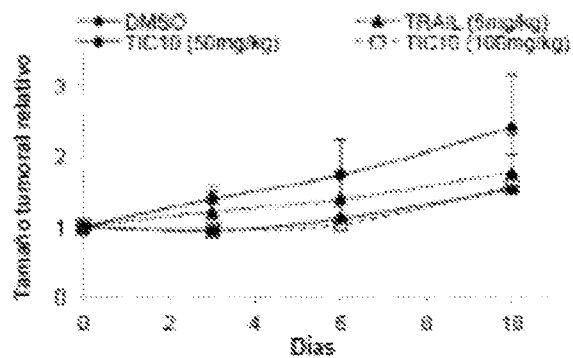


FIGURA 23

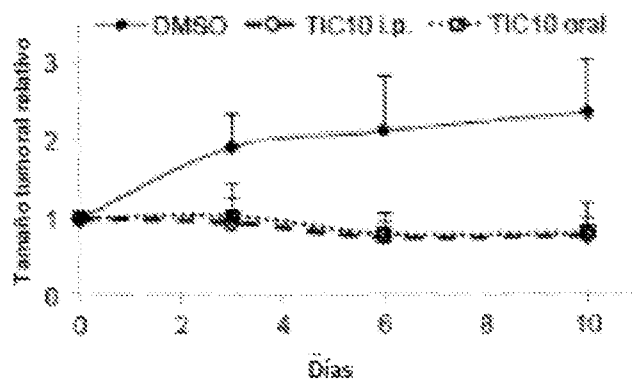


FIGURA 24

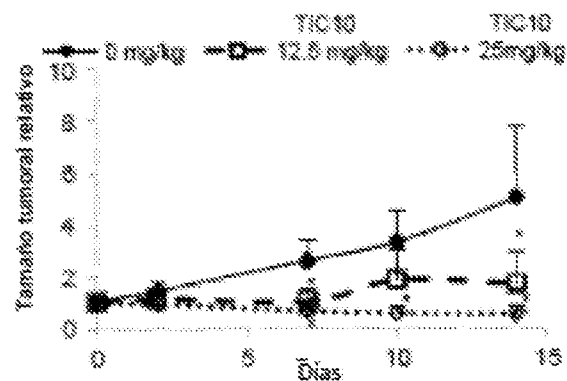


FIGURA 25

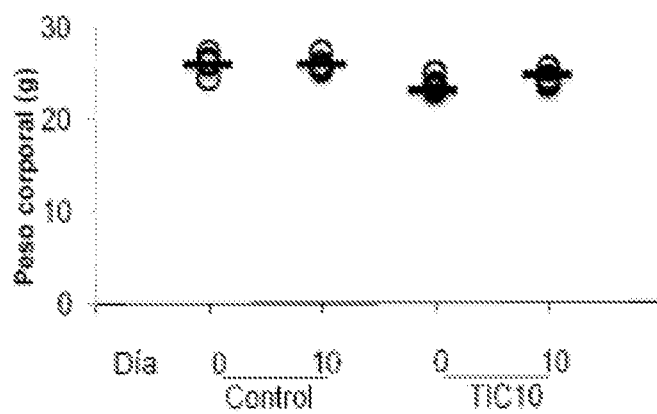


FIGURA 26

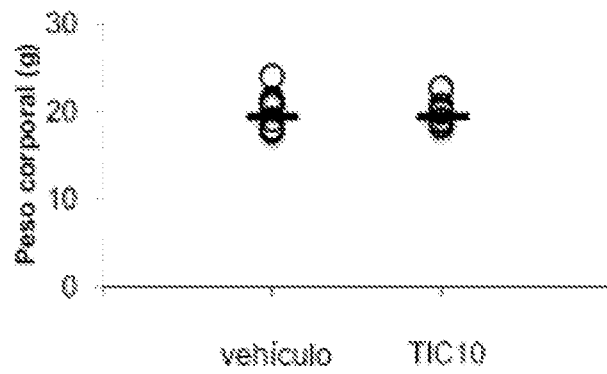


FIGURA 27

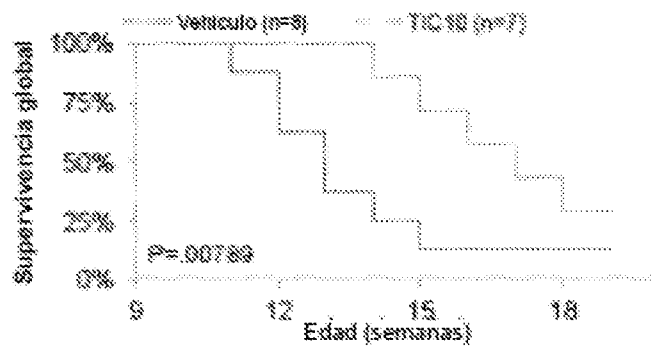


FIGURA 28

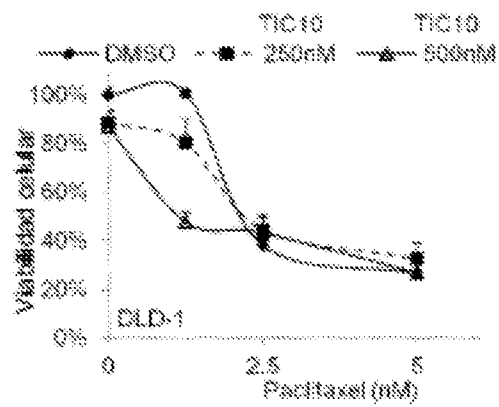


FIGURA 29

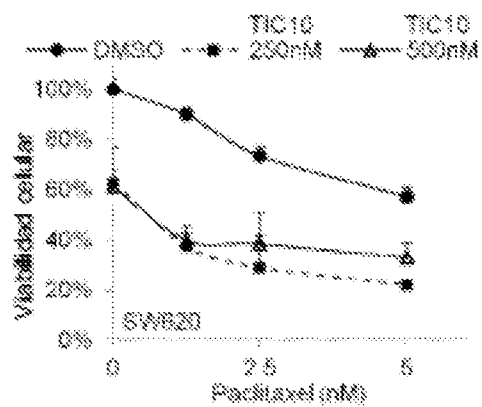


FIGURA 30

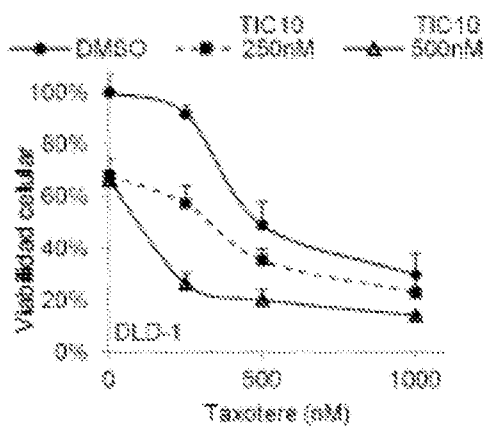


FIGURA 31

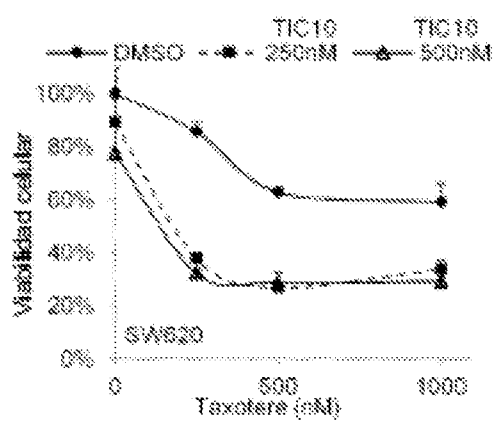


FIGURA 32

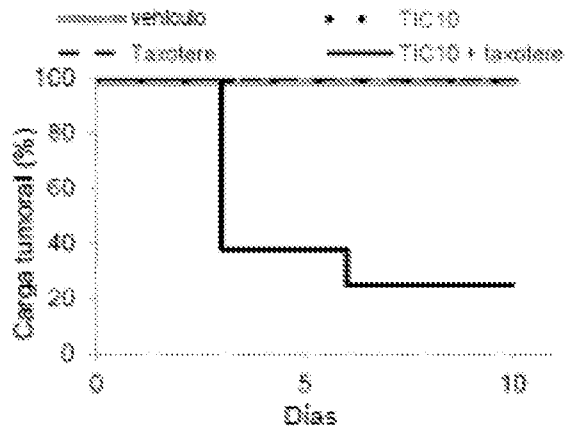


FIGURA 33

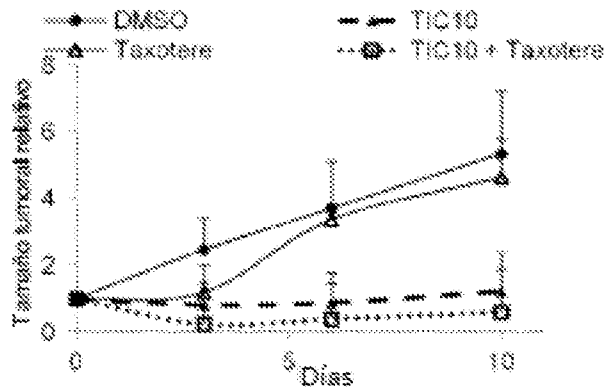


FIGURA 34

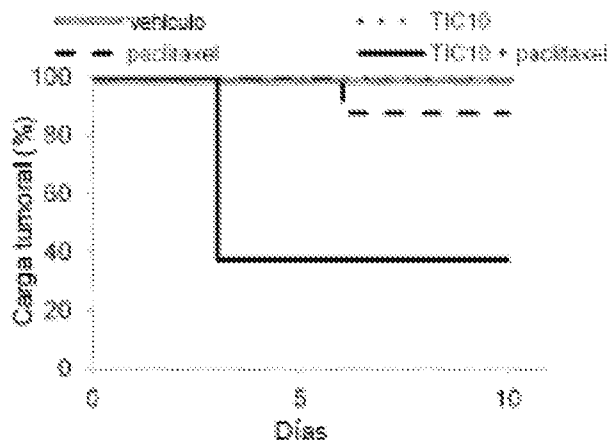


FIGURA 35

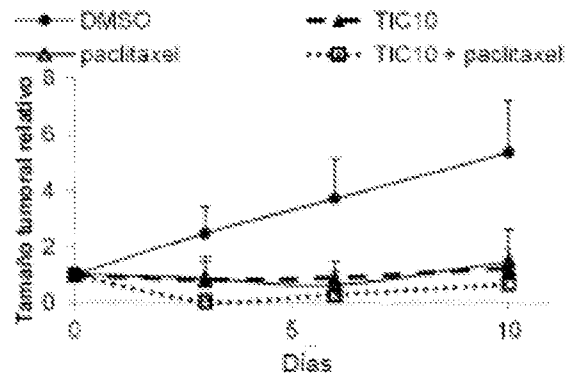


FIGURA 36

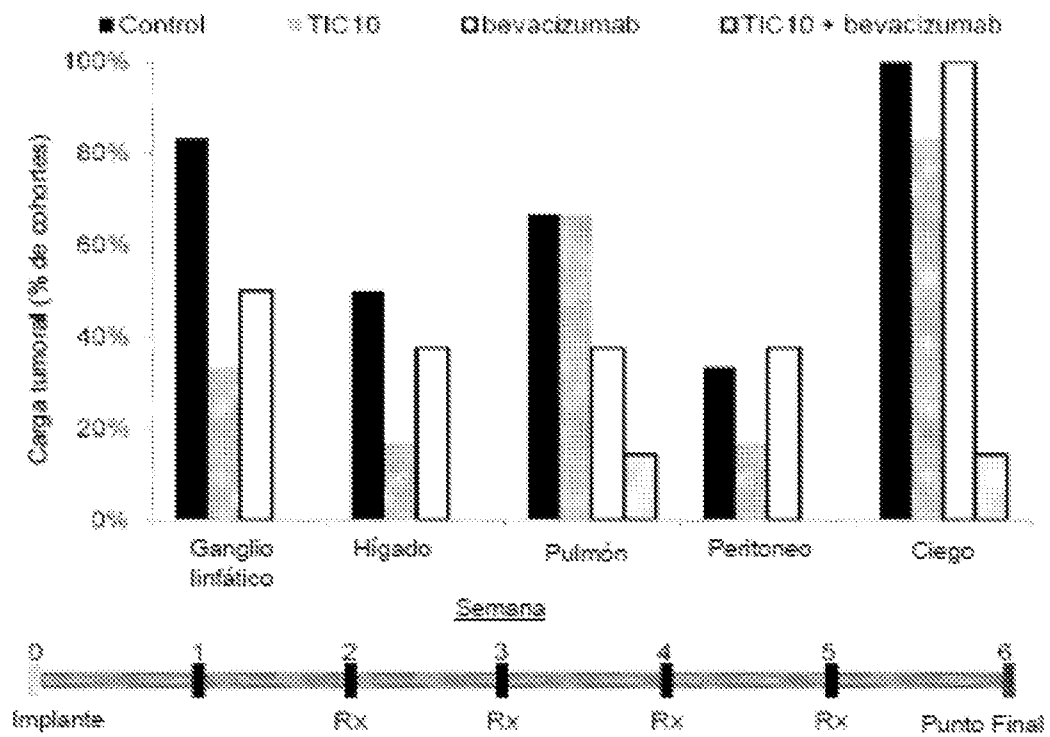


FIGURA 37

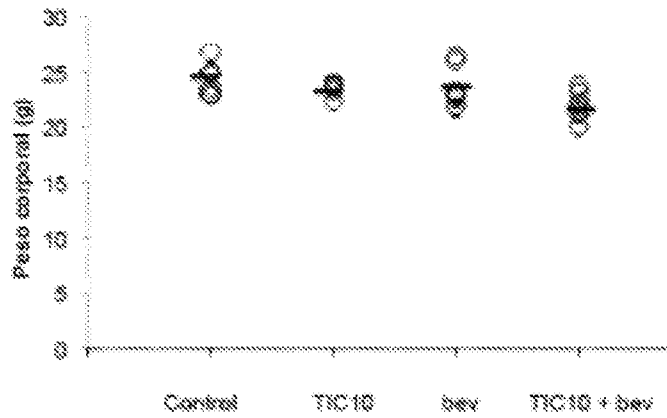


FIGURA 38

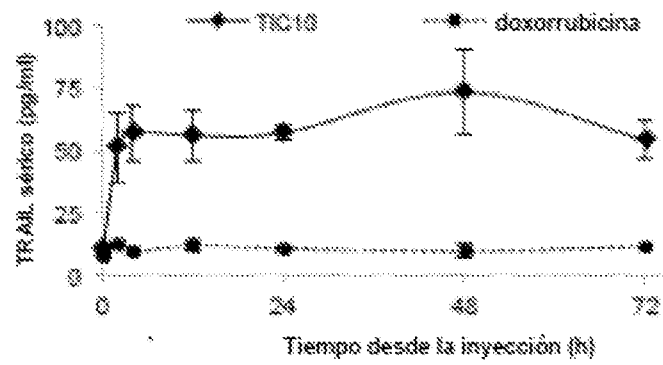


FIGURA 39

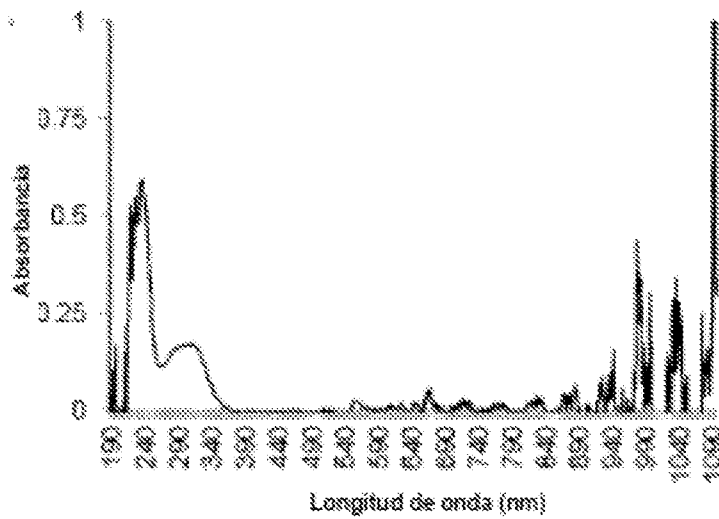


FIGURA 40

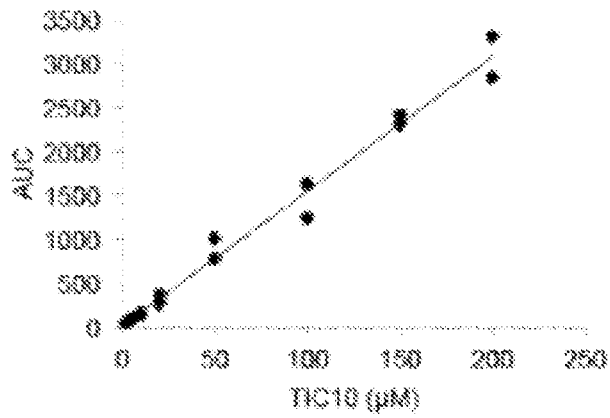


FIGURA 41

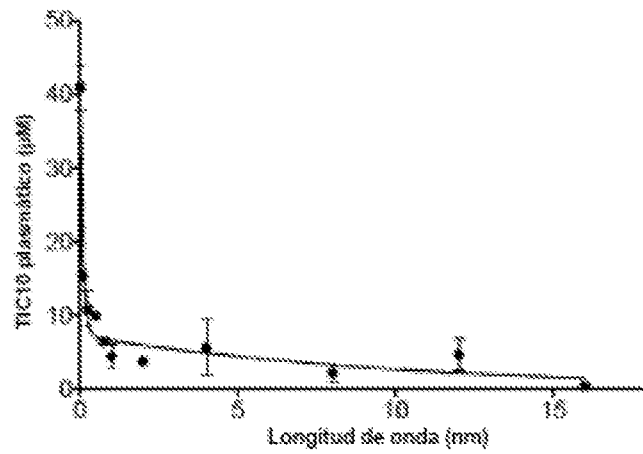


FIGURA 42

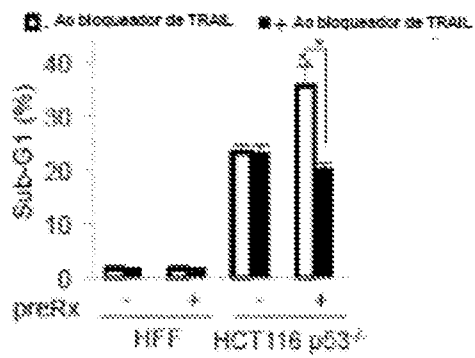


FIGURA 43

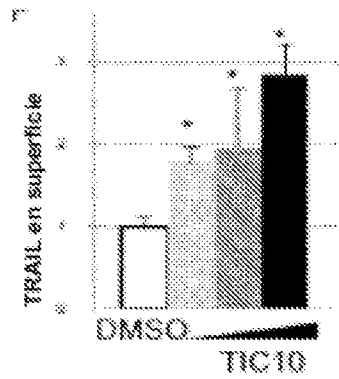


FIGURA 44

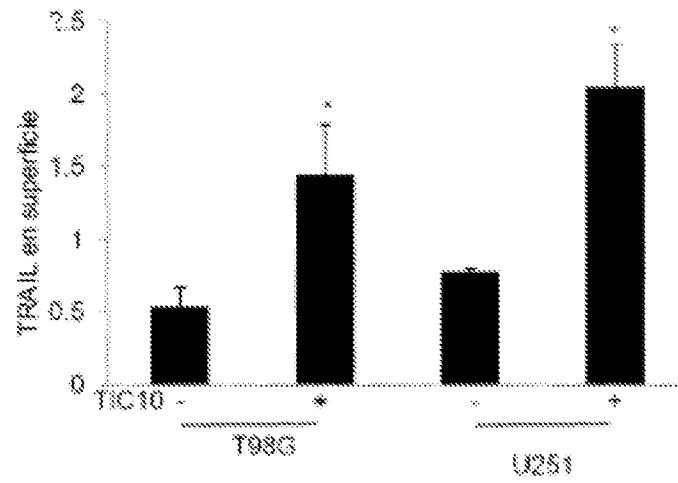


FIGURA 45

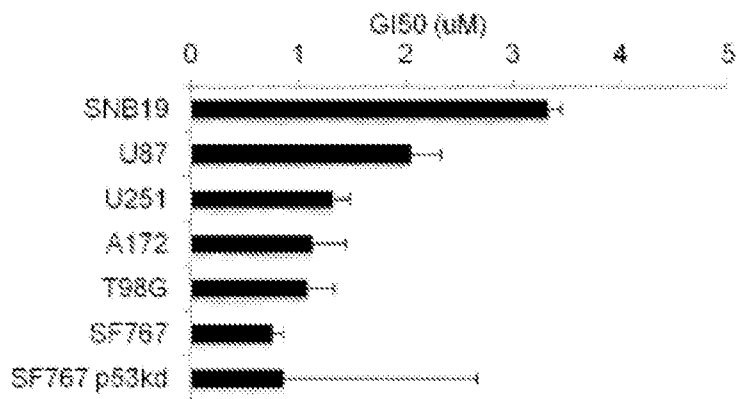


FIGURA 46

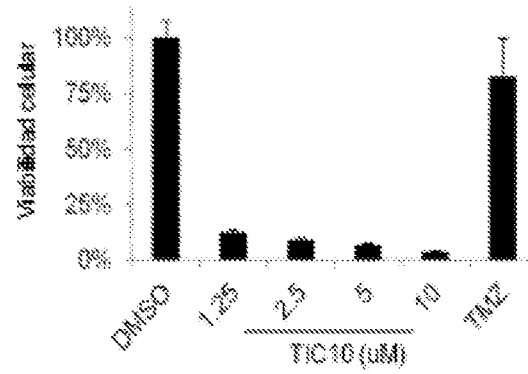


FIGURA 47

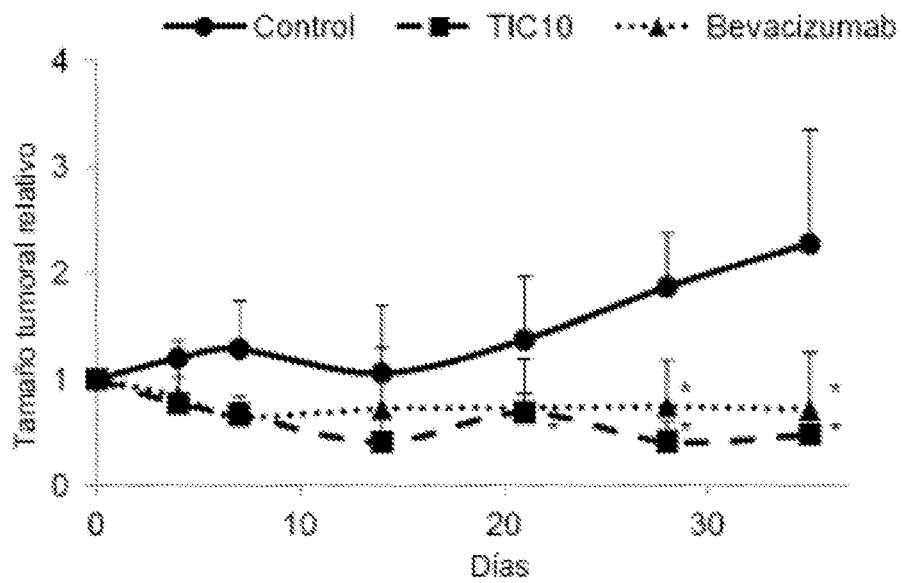


FIGURA 48

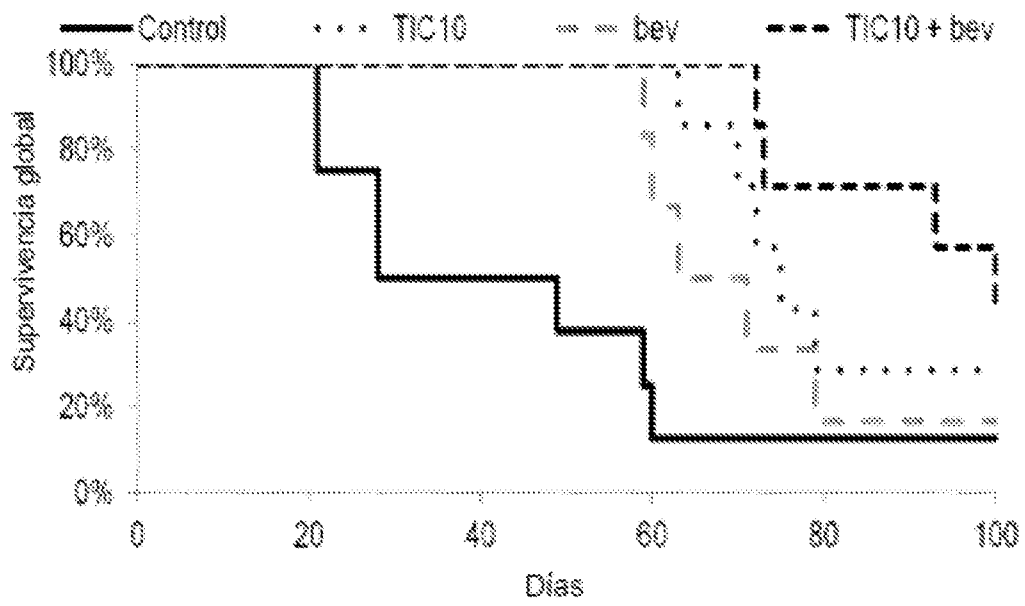


FIGURA 49

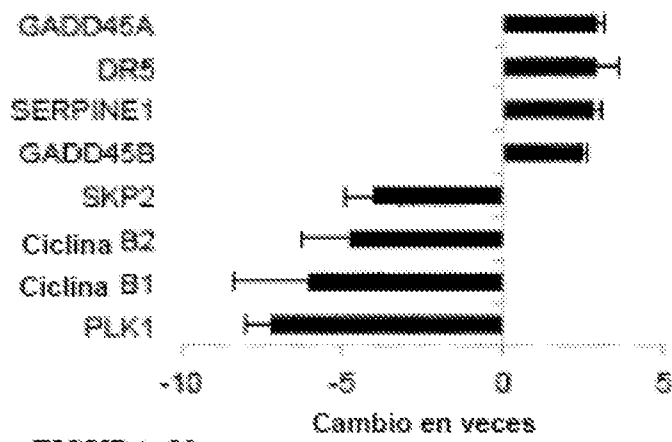


FIGURA 50

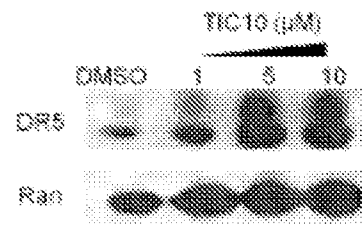


FIGURA 51

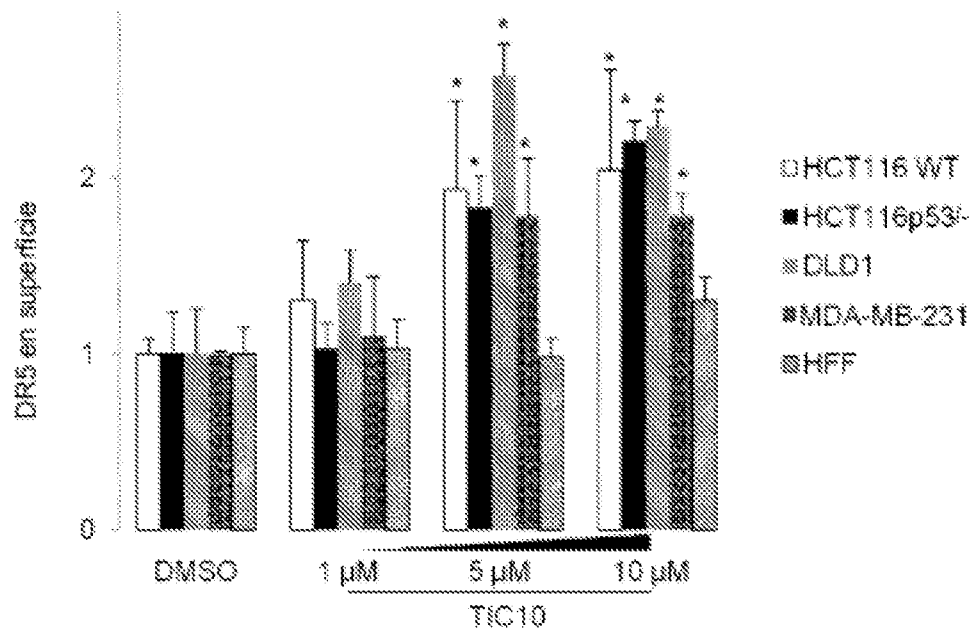


FIGURA 52

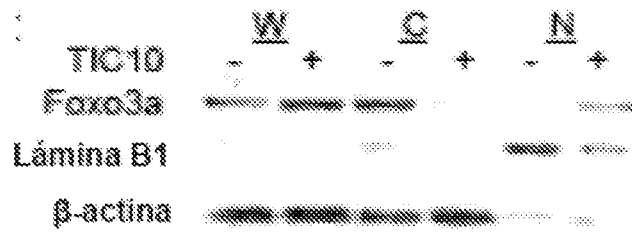


FIGURA 53

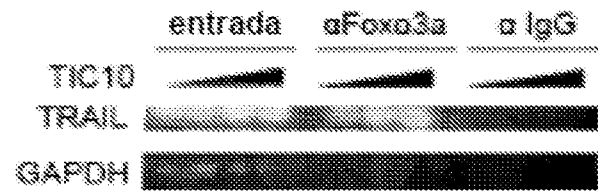


FIGURA 54

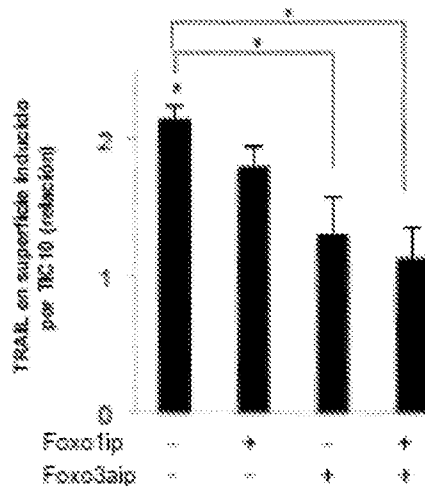


FIGURA 55

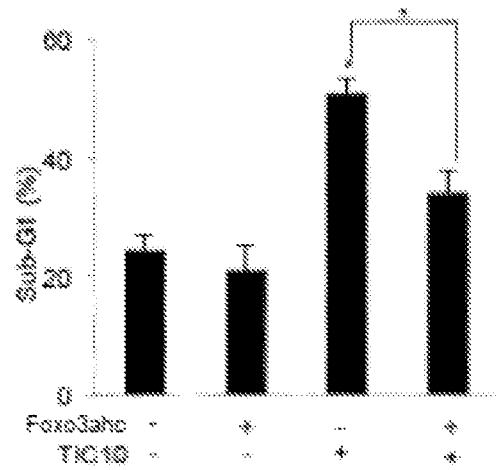


FIGURA 56

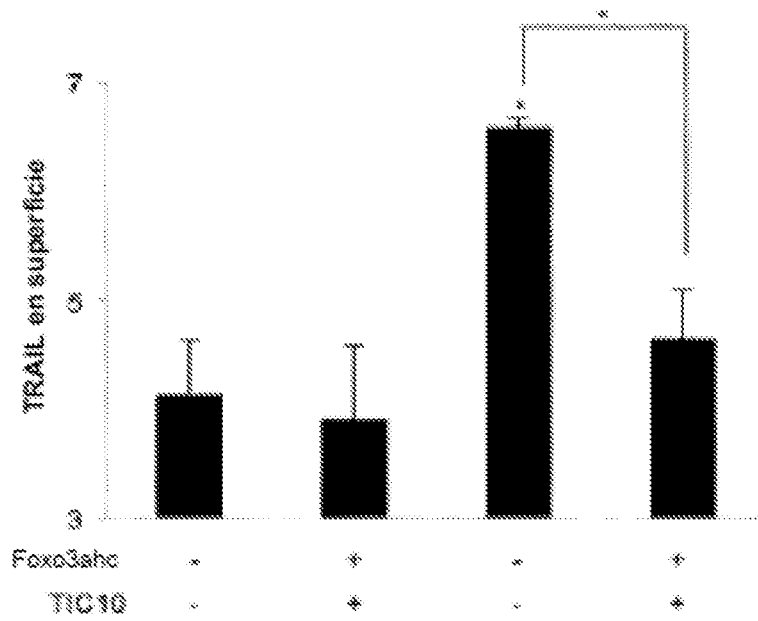


FIGURA 57

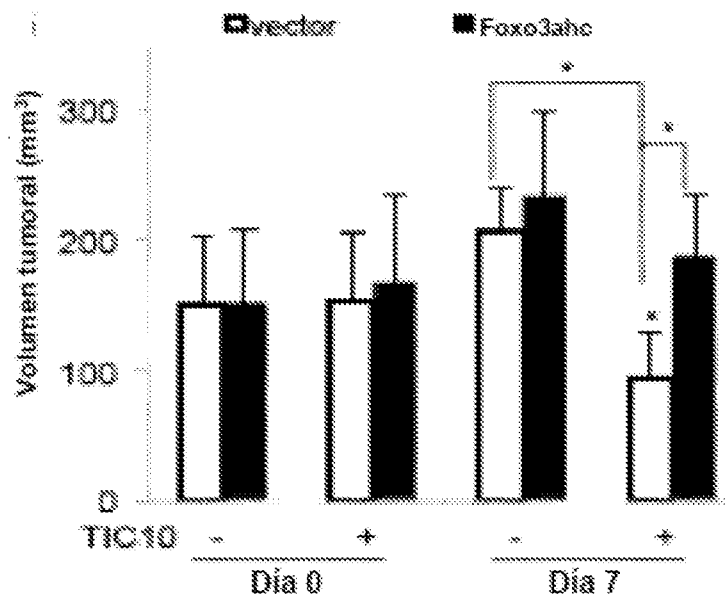


FIGURA 58

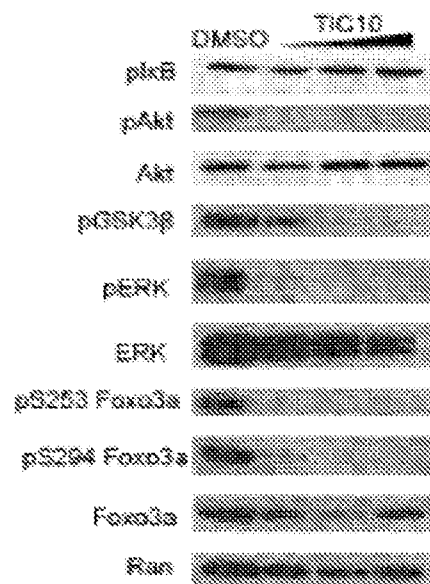


FIGURA 59

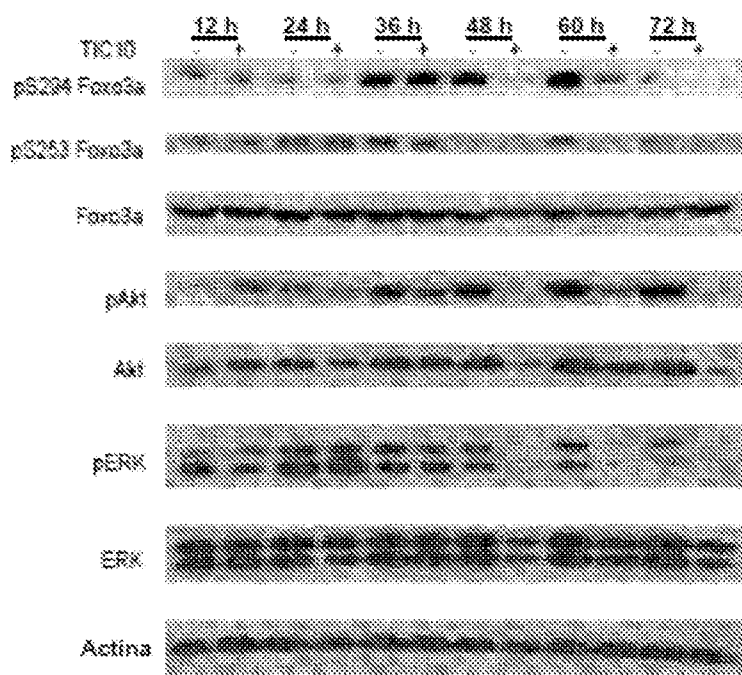


FIGURA 60

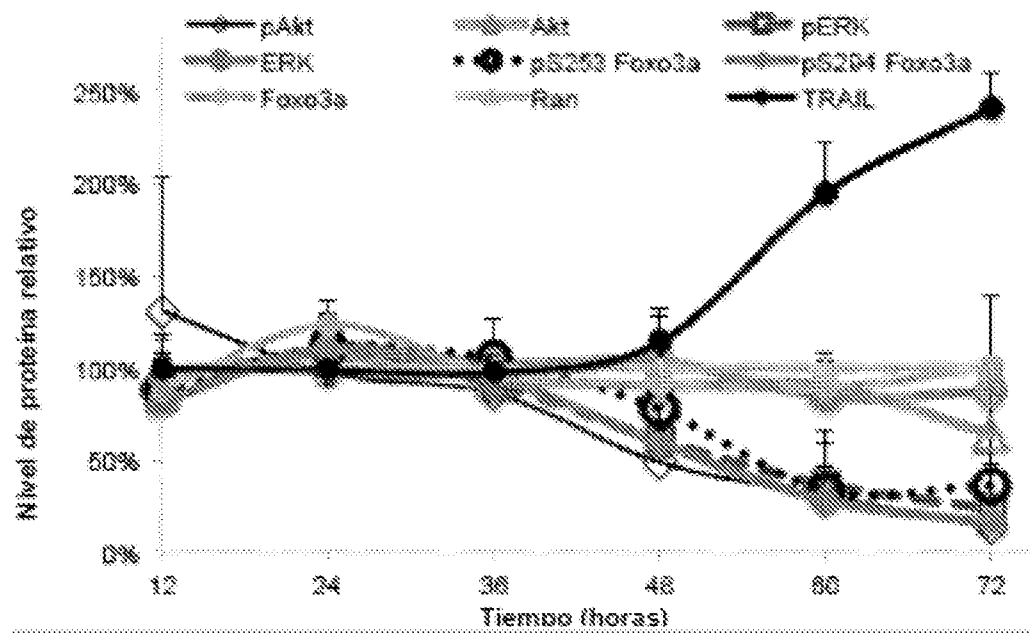


FIGURA 61

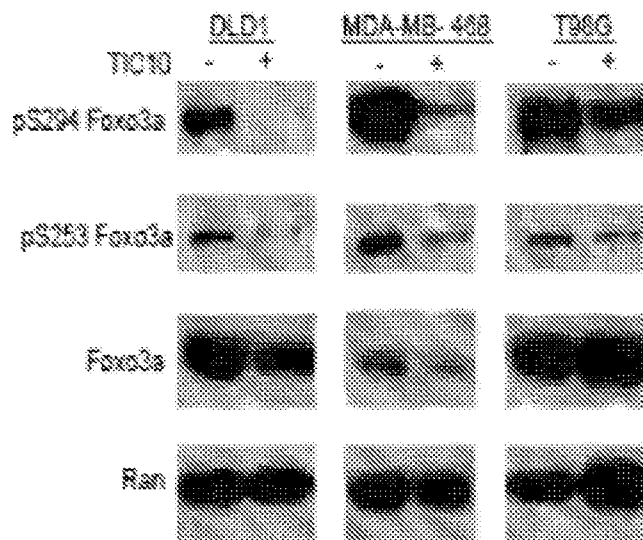


FIGURA 62

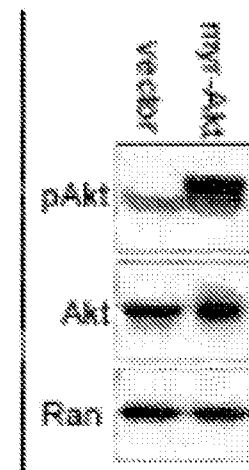


FIGURA 63

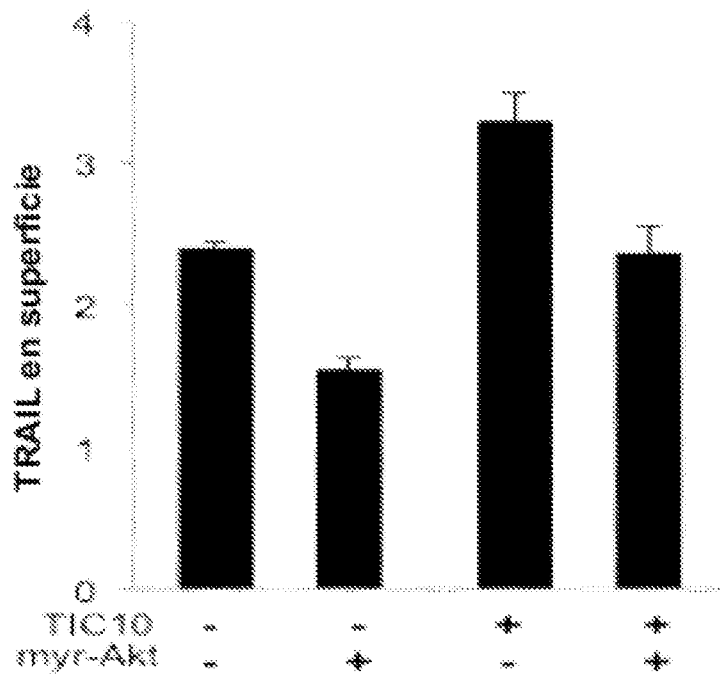


FIGURA 64

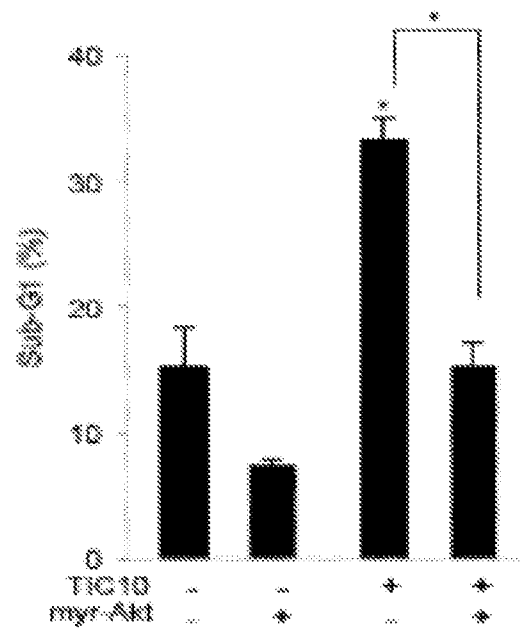


FIGURA 65

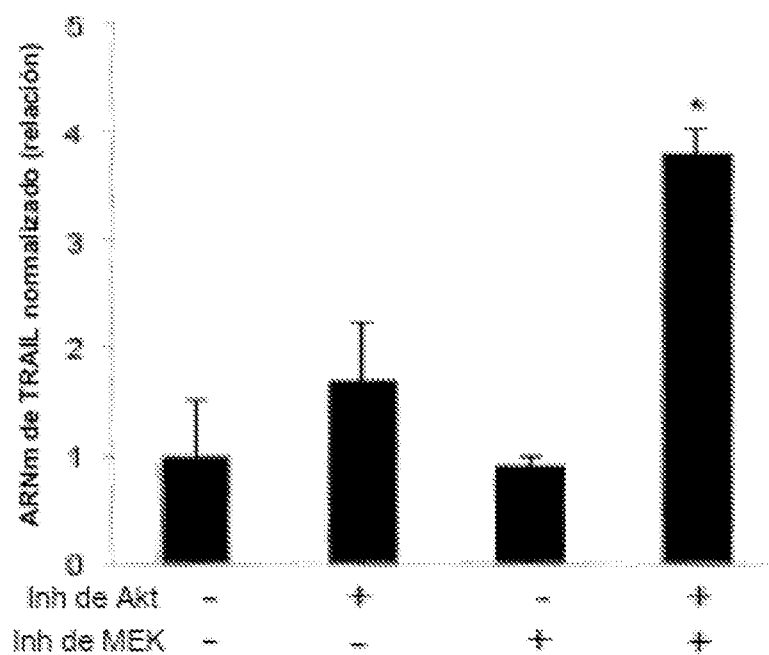


FIGURA 66

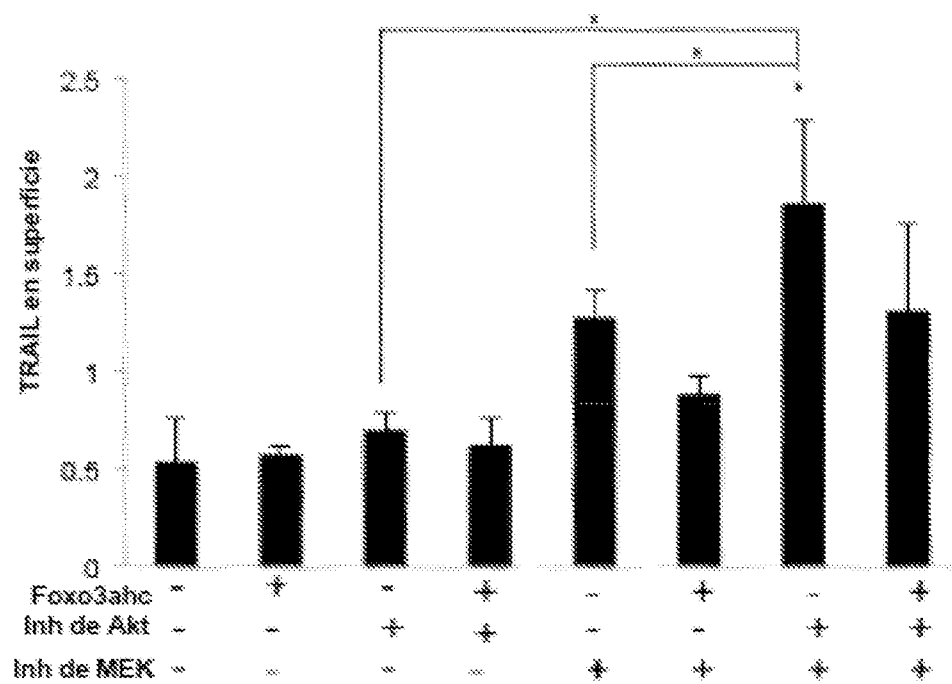


FIGURA 67

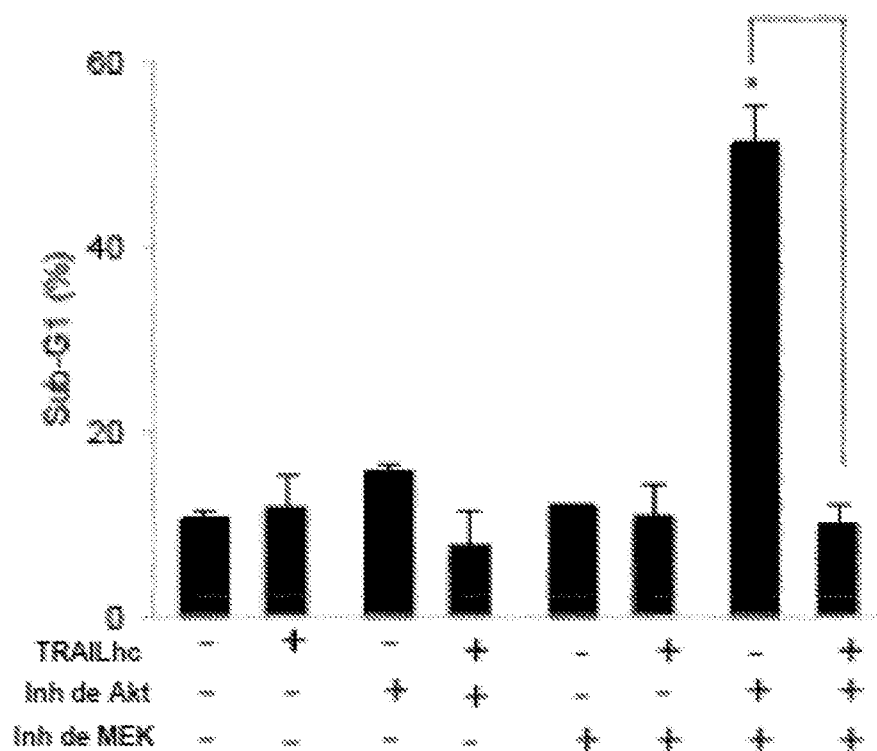


FIGURA 68

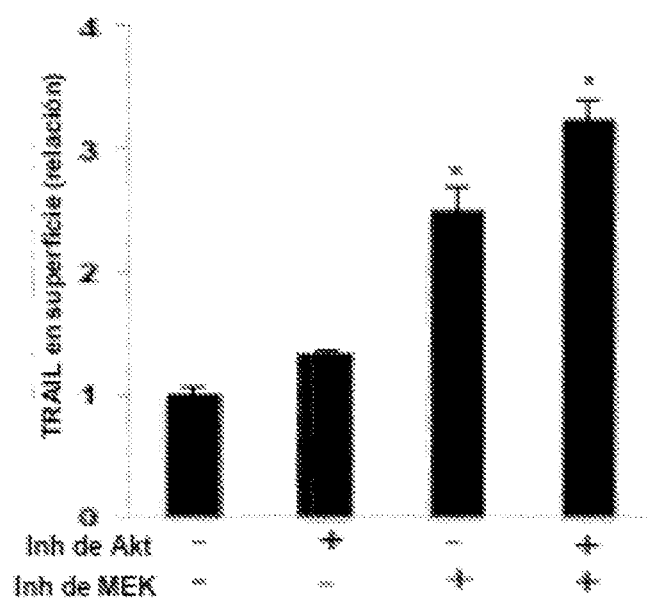


FIGURA 69

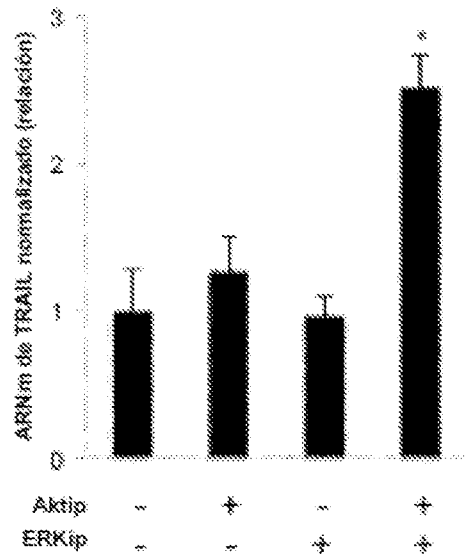


FIGURA 70

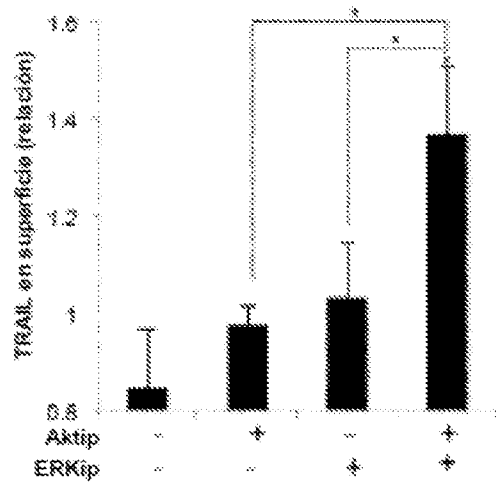


FIGURA 72

FIGURA 71

