Industria y Comerc
SUPERINTENDENC
Republica de Colombi
Ministerio de Comercio, Industria y Turism

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-111691- -00000-0000
Fecha: 2012-07-04 14:43:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 428

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DE

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO: **TERAPIA COMBINADA PARA EL TRATAMIENTO DEL CANCER Y ENSAYOS DE DIAGNOSTICO RELACIONADOS**

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: **A61K 31/454, A61K 31/506, A61K 31/5377, A61K 31/635, A61K 31/675, A61K 45/06, A61P 35/00, G01N 33/48, C12Q 1/68**

71. SOLICITANTE: **ABBOTT LABORATORIES**

DOMICILIO: **100 Abbott Park Road, Abbott Park, Illinois 60064, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

74. APODERADO: **Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.**

22. BOGOTA, D.C., _____

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-111691- -00000-0000
Fecha: 2012-07-04 14:43:18 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 428

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	X Patente de invención X Capítulo I	___ Patente de Modelo de Utilidad ___ Capitulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
	Solicitud Internacional No.	PCT/US2010/058549	Fecha 01/12/2010
	Publicación Internacional No.	WO 2011/068863 A1	Fecha 09/06/2011
3	(54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
	TERAPIA COMBINADA PARA EL TRATAMIENTO DEL CANCER Y ENSAYOS DE DIAGNOSTICO RELACIONADOS		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP		
	A61K 31/454, A61K 31/506, A61K 31/5377, A61K 31/635, A61K 31/675, A61K 45/06, A61P 35/00, G01N 33/48, C12Q 1/68		
5	(71) SOLICITANTE (S) complementaria	___ Esta persona también es inventor.	Para datos adicionales utilizar hoja de información

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
ABBOTT LABORATORIES			

6	DATOS DEL SOLICITANTE		
	DIRECCIÓN	100 Abbott Park Road	No. TELÉFONO
	CIUDAD	Abbott Park	E-MAIL
	DEPARTAMENTO/ESTADO	Illinois 60064	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
	PAÍS DE RESIDENCIA	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	
7	(72) INVENTOR (ES) complementaria		Para datos adicionales utilizar hoja de información

APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1. SHAH	OMAR JAMEEL	ESTADOUNIDENSE
2. SHEN	YU	CHINA
3. LIN	XIAOYA	CHINA
4. ANDERSON	MARK	ESTADOUNIDENSE
5. HUANG	XIAOLI	ESTADOUNIDENSE
6. LI	JUNLING	ESTADOUNIDENSE
7. LI	LEIMING	ESTADOUNIDENSE

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. ESTADOS UNIDOS	Illinois 60046	Lake Villa	25327 W. Columbia Bay Drive
2. ESTADOS UNIDOS	Illinois 60031	Gurnee	7227 Buchanan Drive
3. ESTADOS UNIDOS	Illinois 60031	Gurnee	34198 Old Walnut Circle
4. ESTADOS UNIDOS	Illinois 60030	Grayslake	410 Sommerset Drive
5. ESTADOS UNIDOS	Illinois 60044	Lake Bluff	12545 Meadow Circle
6. ESTADOS UNIDOS	Illinois 60031	Gurnee	1220 Vista Drive
7. ESTADOS UNIDOS	Illinois 60089	Buffalo Grove	1166 Gail Drive

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9 (74) ___ REPRESENTANTE X APODERADO

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CASTELLANOS ABONDANO	MARGARITA	C.C . 39.779.654 T.P . 70.819

DIRECCIÓN	CALLE 94 A No. 7 A-09	No. TELÉFONO	7560770
CIUDAD	BOGOTA	E-MAIL	info@castellanosyco.co
PAÍS	COLOMBIA	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD	X SI ___ NO		
	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
	1. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	**US**	**12/630.957**	**2009/12/04**
	2.			
	3.			

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

___ SI X NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12 DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

___ SI X NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13 REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

___ SI X NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas	**Universidades públicas o privadas**	**Entidades sin ánimo de lucro**
___ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ___ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	___ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	___ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ___ Hoja de información complementaria. ___ Otros, especificar

14 AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ___ SI X NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 12-0063811, 12-0063814	Fecha Junio 25 de 2012

15 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO – APODERADO 04 JUL. 2012

16 ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. X Descripción — N° de folios: **203**
2. X Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: **52**
3. X Dibujos y/o figuras — N° folios: **30**
4. X Resumen.
5. ___ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ___ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. X Arte final 12 x 12.
8. ___ Anexo formatos digitales

Documentación Jurídica

9. X Poderes, si fuera el caso.
10. ___ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante
11. ___ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ___ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. ___ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica
14. X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ___ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ___Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. X Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

P2511

000003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0063811

Bogotá D.C., Junio 25 de 2012 - 11:14:09

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	186250971	22/06/2012	11.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	590.000.00	590.000.00
				$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-111691- -00000-0000
Fecha: 2012-07-04 14:43:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 428

000001

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0063814

Bogotá D.C., Junio 25 de 2012 - 11:14:09

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	186250971	22/06/2012	11.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
22	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	660.000.00
				$660.000.00

==========

SON: **SEISCIENTOS SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-**-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-111691- -00000-0000
Fecha. 2012-07-04 14:43:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra 11 PATENTE!Y!I Eve 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 428

000005

21661

COLOMBIA

PODER

El (los)

ABBOTT LABORATORIES

Domiciliados en

100 Abbott Park Road
Abbott Park
Illinois 60064
E.U.A.

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso –administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
b) Para la obtención de registros sanitarios;
c) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy 19 de Noviembre de 2008

en Abbott Park, Illinois,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

por ABBOTT LABORATORIES
(firma ilegible) Paul D. Yasger
(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned

ABBOTT LABORATORIES

Of

100 Abbott Park Road
Abbott Park
Illinois 60064
USA

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS** a. attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, to

and to obtain the protection of my (our Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
b) For the obtainment of Sanitary registrations;
c) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters ~~they~~ may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this 19 day of November, 2008

in Abbott Park, Illinois, USA 60064

by Paul D. Yasger, Assistant Secretary, DVP, Associate General Counsel
(Notary shall execute on the other side)

(Consular legalization or apostille is required)

CASTELLANOS & CO
ABOGADOS COLOMBIA
Calle 94A No. 7A-09- P.O.Box 6349 - Bogotá, Colombia
Tels.: (571) 610 74 20 / - Fax (571) 610 07 06 - e-mail info@castellanosyco.com

*Abbott at its sole discretion

COLOMBIA

CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)

Hoy 19de Nov. del año 2008
compareció (eron) personalmente
Paul D. Yasger

a quienes conozco como la(s) personas que firma(n) en representación de la Sociedad (Compañía) denominada **ABBOTT LABORATORIES**

Certifico :

a) Que **ABBOTT LABORATORIES**

es una sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Estados Unidos de América

b) Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es

100 Abbott Park Road
Abbott Park
Illinois 60064
EUA

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad /Compañía.

d) Que el Sr. Paul D. Yasger

esta autorizado para otorgar el presente poder. Lo anterior esta probado por medio de los siguientes documentos, que certifico he visto*

(Ciudad) Abbott Park

(Estado) Illinois

Hoy 19del Noviembre de 2008

(Notario Público)

*Los documentos debe identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL CERTIFICATION (Corporation)

On this 19 day of November of 2008
personally appeared Paul D. Yasger,
whom I know to be the person(s) who signed this document as representative(s) of the Corporation /Company named
ABBOTT LABORATORIES

I certify:

a) That **ABBOTT LABORATORIES**

is a corporation (Company legally constituted and in existence in accordance with the laws of United States of America

b) That the domicile of said Corporation/Company is

100 Abbott Park Road
Abbott Park
Illinois 60064
USA

c) That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the object set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

d) That Mr. Paul D. Yasger

is (are) authorized to grant the present Power of Attorney. The aforementioned was duly proven through the following documents and I duly certify having seen them*:Appointment of Corporate Officer dated March 6, 2008 and signed by Mile D. White, Chairman of the Board and Chief Executive Office of Abbott Laboratories

(City) Abbott Park

(State) Illinois

this 19th day of November of the year 2008

(Notary Public)

*Documents must be identified with date and origin

OFFICIAL SEAL
LINDA S LUTZ
NOTARY PUBLIC - STATE OF ILLINOIS
MY COMMISSION EXPIRES:07/23/11

CASTELLANOS & CO
ABOGADOS COLOMBIA
Calle 94A No. 7A-09- P.O.Box 6349 - Bogotá, Colombia
Tels.: (571) 610 74 20 / - Fax (571) 610 07 06 - e-mail info@castellanosyco.com

000007

STATE OF ILLINOIS

SECRETARY OF STATE

SPRINGFIELD, ILLINOIS

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by LINDA S LUTZ

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, MCHENRY COUNTY

4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

Certified

5. Springfield, Illinois

6. NOVEMBER 26, 2008

7. by the Secretary of State, State of Illinois

8. No. S08DL14032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Jesse White

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS

Printed on recycled paper. Printed by authority of the State of Illinois. May 2008 — 50M — I 168.2

----------TRADUCCION OFICIAL No. 081205----------

de un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 de Minjusticia, al igual que la presente.----------

(Adjunto a un documento de PODER de Abbott Laboratories)

(fdo) ilegible

Notario Público

SELLO OFICIAL

Notario Público – Estado de Illinois

LINDA S. LUTZ

Mi comisión vence 07/23/11

ESTADO DE ILLINOIS

Secretario de Estado

Springfield, Illinois

APOSTILLA

(Convención de La Haya de 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por LINDA S. LUTZ
3. actuando en su calidad de Notario Público, Condado de McHenry
4. lleva el sello del Estado de Illinois

CERTIFICADO

5. en Springfield, Illinois
6. El día 26 de Noviembre de 2008
7. Por el Secretario de Estado, Estado de Illinois
8. No. S08DL14032
9. Sello
10. Firma: (fdo) Jesse White

JESSE WHITE

Secretario de Estado

Estado de Illinois (Sello en oblea dorada)

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Diciembre 17, 2008

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2008 DIC 17 P 12: 14

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

854400

QUIEN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
AS FUNCIONES INDICADAS

12644754 1/4

0000

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

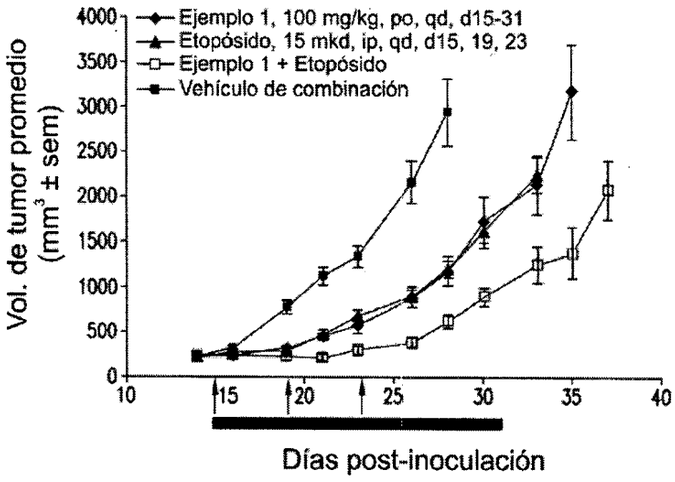


FIG.1

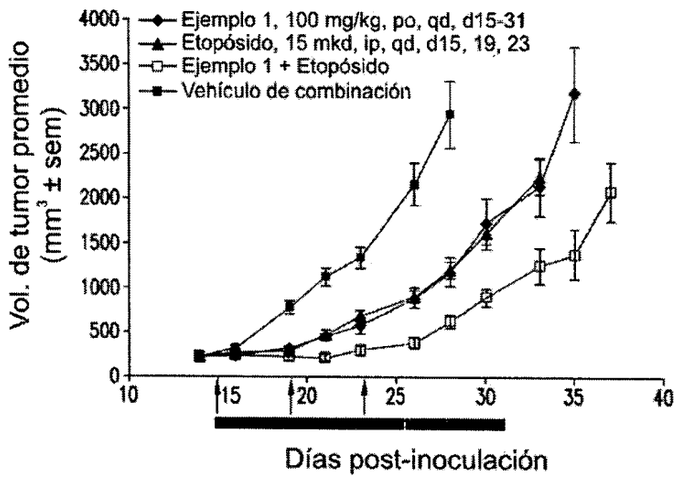


FIG.1

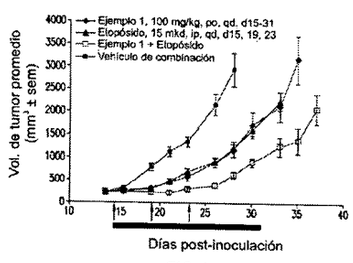


FIG.1

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
9 June 2011 (09.06.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/068863 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 31/454 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
A61K 31/635 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/058549

(22) International Filing Date:
1 December 2010 (01.12.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
12/630,957 4 December 2009 (04.12.2009) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **ABBOTT LABORATORIES** [US/US]; 100 Abbott Park Road, Abbott Park, Illinois 60064 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **SHAH, Omar Jameel** [US/US]; 25327 W. Columbia Bay Drive, Lake Villa, Illinois 60046 (US). **SHEN, Yu** [CN/US]; 7227 Buchanan Drive, Gurnee, Illinois 60031 (US). **LIN, Xiaoya** [CN/US]; 34198 Old Walnut Circle, Gurnee, Illinois 60031 (US). **ANDERSON, Mark** [US/US]; 410 Sommerset Drive, Grayslake, Illinois 60030 (US). **HUANG, Xiaoli** [US/US]; 12545 Meadow Circle, Lake Bluff, Illinois 60044 (US). **LI, Junling** [US/US]; 1220 Vista Drive, Gurnee, Illinois 60031 (US). **LI, Leiming** [US/US]; 1166 Gail Drive, Buffalo Grove, Illinois 60089 (US).

(74) Agent: **MANZARI, Oona A.**; Abbott Laboratories, 100 Abbott Park Road, AP6A-1/Dept. 0377, Abbott Park, Illinois 60064 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: COMBINATION THERAPY FOR TREATING CANCER AND DIAGNOSTIC ASSAYS FOR USE THEREIN

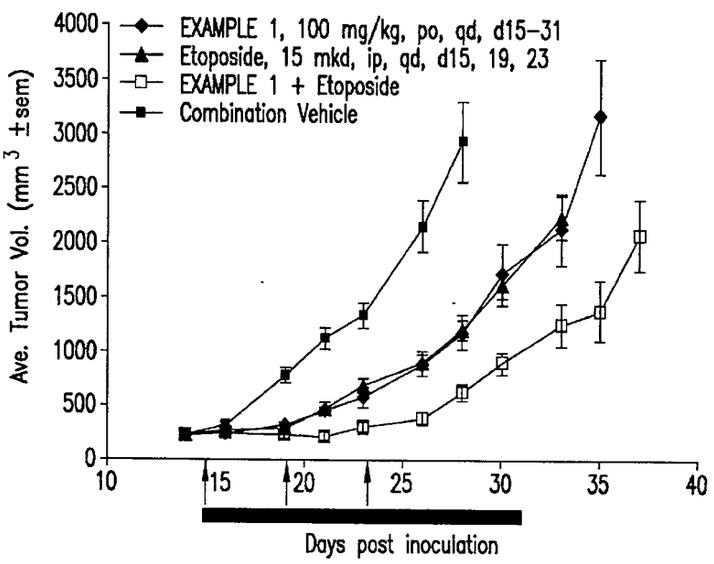


FIG.1

(57) Abstract: The present disclosure relates to a combination of therapeutic agents for use in treating a patient suffering from cancer, wherein said combination comprises at least one polyploidy inducing agent and at least one Bel - 2 family protein inhibitor. In addition, the present disclosure also relates to diagnostic assays useful in classification of patients for treatment with one or more therapeutic agents.

WO 2011/068863 A1

WO 2011/068863 A1

(84) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

COMBINATION THERAPY FOR TREATING CANCER AND DIAGNOSTIC ASSAYS FOR USE THEREIN

This application is a continuation-in-part of U.S. Serial No. 12/120,914, filed on May 15, 2008, which is a divisional of U.S. Serial No. 11/432,937, filed on May 12, 2006, now U.S. Patent 7,390,799, which claims priority to U.S. Provisional Application Ser. No. 60/718,618, September 20, 2005 and U.S. Provisional Application Ser. No 60/680,107, May 12, 2005.

FIELD

The present disclosure relates to a combination of therapeutic agents for use in treating a patient a subject suffering from cancer. The combination comprises (1) at least one polyploidy inducing agent; and (b) at least one Bcl-2 family protein inhibitor. In addition, the present disclosure also relates to diagnostic assays useful in classification of patients for treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor. In particular, the present disclosure relates to identifying the presence or absence of at least one mutation in a BAX gene, a BAK gene or a NOXA gene and then classifying patients as eligible for receiving treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor.

BACKGROUND

Anti-apoptotic Bcl-2 family protein members are associated with a number of diseases and thus are under investigation as potential therapeutic drug targets. These important targets for interventional therapy include, for example, the Bcl-2 family of proteins Bcl-2, Bcl-X_L and Bcl-w. Recently inhibitors of Bcl-2 family members have been reported in the literature, see, for example, WO 2005/049594, Oltersdorf, et. al., *Nature*, 435:677-681 (2005), US 6,720,338 and US 7,030,115. While this art teaches inhibitors having high binding to the target protein, this is only one of many parameters that must be considered as a compound is investigated for further or continued drug development. As part of this development, it is highly desirable to produce compounds

that are efficacious in animal models of cancer after oral administration. To achieve this oral efficacy, it is well known in the art that a compound must not only display potent activity against a tumor type or cell line under investigation, but must also achieve acceptable levels of systemic exposure after oral administration. A typical measure of a compound's cellular activity is the concentration eliciting 50% cellular effect (EC_{50}). A typical measure of systemic exposure is the area under the curve resulting from graphing the plasma compound concentration after oral administration vs. time (AUC). The ratio between these parameters (AUC/EC_{50}) is well known in the art to constitute a useful pharmacodynamic parameter to predict oral efficacy.

In one aspect, this disclosure is directed to a series of haloalkylsulfonylaryl analogs that demonstrate enhanced and unexpected properties with respect to cellular efficacy and systemic exposure after oral administration in animals. Specifically, compounds of this disclosure maintain potent cellular efficacy while exhibiting suitable systemic exposure after oral administration to animals. This results in AUC/EC_{50} ratios significantly higher than that of the compounds taught in the art. Other aspects of the disclosure are disclosed and apparent herein.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG. 1 shows comparative antitumorigenesis of EXAMPLE 1, etoposide and combinations thereof on B-cell lymphoma.

FIG. 2 shows comparative antitumorigenesis of EXAMPLE 1, vincristine and combinations thereof on B-cell lymphoma.

FIG. 3 shows comparative antitumorigenesis of EXAMPLE 1, CHOP and combinations thereof on B-cell lymphoma.

FIG. 4 shows comparative antitumorigenesis of EXAMPLE 1, rituximab and combinations thereof on B-cell lymphoma.

FIG. 5 shows comparative antitumorigenesis of EXAMPLE 1, rapamycin and combinations thereof on B-cell lymphoma.

FIG. 6 shows comparative antitumorigenesis of EXAMPLE 1, R-CHOP and combinations thereof on mantle cell lymphoma.

FIG. 7 shows comparative antitumorigenesis of EXAMPLE 1, bortezomib and combinations thereof on mantle cell lymphoma.

FIG. 8 shows that the BH3 mimetic ABT-263 and the pan-Aurora inhibitor VX-680 are synergistically lethal. FIG. 8A shows that VX-680 was screened at a single, fixed dose (1 μM) in combination with 19 other chemotherapeutics in 6-pt dose-response in a panel of 7 cell lines derived from various solid malignancies. Cell viability was determined 3 days after exposure to the combination regimens. Synergy or antagonism of drug combinations was determined using the Bliss additivism model of drug-drug interactions (See, Berenbaum, M.C., *Cancer Res* 35, 269-335 (1981)). The value in excess of Bliss additivism for each dose was determined for all combinations and defined as follows: >15 = synergistic, 0-15 = no interaction, <-15 = antagonistic. These values are expressed in a heatmap using SPOTFIRE® (TIBCO®) data analysis software where synergy is indicated in red, no interaction in gray, and antagonism in blue. Each dose response included a point for VX-680 alone (0 μM combination compound). These values are not applicable for Bliss analysis and were excluded from the heatmap. Compounds tested in combination are shown at the right. The targets/mechanisms of action of each of these agents and the corresponding dose responses for the combination screen is summarized in Table A in EXAMPLE 40. FIG. 8B shows Bliss analysis of cell viability determinations for VX-680 in combination with ABT-263 in dose-response in D54MG, HCT116, SW620, A549, PC3, and EJ1 cells. FIG. 8C shows cell viability determinations analyzed in FIG. 8B.

FIG. 9 shows that inhibition of Aurora B and Bcl-X_L is sufficient for synergistic cytotoxicity. FIG. 9A shows HCT116 colon carcinoma cells were either not transfected or transfected with the luciferase, Aurora A, or Aurora B siRNAs respectively. 24 hours post-transfection, cells were treated with ABT-263 in dose response, and cell viability was determined 72 hours after the addition of ABT-263. FIG. 8B shows immunoblots of HCT116 lysates demonstrated knockdown of target proteins 72 hours post-transfection with siRNAs used in FIG. 9A. MLN8054 (FIG. 9C) or AZD1152 (FIG. 9D) were tested in combination with DMSO or 1 μM ABT-263 in HCT116 cells. Cell viability was determined 72 hours after treatment. FIG. 8E shows immunoblots of HCT116 lysates demonstrated knockdown of Bcl-2, Bcl-X_L, and Mcl-1 72 hours post-transfection. EJ1

(FIG. 9F) or HCT116 (FIG. 9G) cells were transfected with a luciferase siRNA or the same set of siRNAs against Bcl-2, Bcl-X_L, or Mcl-1 siRNAs as in FIG. 9E. 24 hours post-transfection, cells were treated with different amounts of AZD1152. Cell viability was determined 72 hours after exposure to AZD1152. FIG. 9H shows HCT116 cells were transfected with different amount of Aurora B or Bcl-X_L siRNAs individually or in combination. Cell viability was determined 72 hours post-transfection. In all figures, cell viability was expressed as the percentage of untransfected, DMSO-treated control cells. The red viability curve represents a synergistic combination.

FIG. 10 shows that polyploidization renders cells Bcl-X_L dependent. FIG. 10A shows that HCT116 cells were transfected with INCENP or Bcl-X_L siRNAs in dose-response individually or in combination. Cell viability was determined 72 hours post-transfection. The red curve represents a synergistic combination. FIG. 10B shows immunoblots of HCT116 lysates demonstrated knockdown of INCENP 72 hours post-transfection with the same siRNA as in FIG. 10A. HCT116 cells (FIG. 10C-FIG. 10F) were treated for 24 hours with DMSO or 200 nM AZD1152. AZD1152 was then either left in the culture medium (AZD1152) or washed out by replacing the medium with drug-free growth medium (AZD1152 washout). Cells were cultured for an additional 72 hours before being subjected to the following treatment/analysis: Western analysis (FIG. 10C) to determine the amounts of p53, phosphorylated ($pSer^{10}$) and unphosphorylated histone H3, or Phase contrast imaging (FIG. 10D) to show morphological signs of polyploidy, such as dramatically increased cell size and multinucleation, in AZD1152 treated cells regardless of washout, further treatment of 1 μM ABT-263 for 4 hours (FIG. 10E) and assaying for Caspase-3 activity, and further treatment with 1 μM ABT-263 (FIG. 10F) for 24 hours and assaying for cell viability.

FIG. 11 shows that modulation of the Bcl-2 network during polyploidization. HCT116 cells (FIG. 11A) were treated with DMSO or 200 nM AZD1152 for 72 hours followed by 2 hours with 1 μM ABT-263. Conformationally active BAK or BAX was immunoprecipitated and detected by immunoblotting. D54MG and HCT116 cells (FIG. 11B) were treated DMSO or 200 nM AZD1152 for 72 hours prior to the addition of 1 μM ABT-263 for 4 hours. Conformationally active BAK or BAX was immunoprecipitated and detected by immunoblotting (top and middle panel). Cell lysates

were also fractionated and Cytochrome C release into the cytosolic fraction was detected by immunoblotting. HCT116, SW620, and D54MG cells (FIG. 11C) were treated with DMSO (untreated) or 200 nM AZD1152 (AZD1152) for 72 hours and the expression of Bcl-2 network components were detected by immunoblotting (FIG. 11D- FIG 11E) HCT116 cells were treated as in FIG. 11B. Endogenous Bcl-X_L and Mcl-1 were immunoprecipitated, and the Bcl-2 network components in the immunecomplexes were detected by immunoblotting.

FIG. 12 shows that elements of Bcl-2 network are required for Bcl-X_L "addiction" in polyploid cells and for polyploidization-mediated apoptosis. FIG. 12A shows a focused library of siRNAs targeting Bcl-2 network components was transfected as individual oligos into HCT116 cells. EJ1 and DLD1 cells (FIG. 12B) were transfected with individual NOXA siRNAs or BAX and BAK siRNAs in combination. In both FIG. 12A and FIG. 12B, 24 hours post-transfection, cells were treated with 200 nM AZD1152 to induce polyploidy. 72 hours after the addition of AZD1152, cells were treated with 1 μM ABT-263 and cell viability was determined 24 hours after the addition of ABT-263. HCT116 cells (FIG. 12C and FIG. 12D) were transfected with a control, nontargeting siRNA or a NOXA siRNA. 24 hours post-transfection, cells were treated with 200 nM AZD1152 for 72 hours. 1 μM ABT-263 was then added for 2 hours prior to cell lysis and immunoprecipitation of Bcl-X_L or Mcl-1. HCT116 (FIG. 12E) cells were transfected with the focused siRNA library as in FIG. 12A. 24 hours post-transfection, cells were treated with 200 nM AZD1152 to induce polyploidy. AZD1152 was washed out by replacing the medium with drug-free growth medium 3 and 7 days after the addition of AZD1152. Cell viability was determined 10 days after the addition of AZD1152 to assess polyploidization-induced lethality.

FIG. 13 shows that ABT-263 and AZD1152 produce synergistic tumor growth inhibition *in vivo*. FIG. 13A shows the growth curve of HCT116 tumors in mice when administered vehicle, ABT-263, AZD1152, or the combination of AZD1152 and ABT-263 as indicated in Example 40. CT116 tumor-bearing mice (FIG. 13B) were treated with vehicle or AZD1152 (100 mg/kg/day (hereinafter "mkd", IP, QD) for 3 consecutive days prior to the administration of vehicle or ABT-263 (75 mkd, PO). 4 hours and 8 hours after the administration of ABT-263, tumors were collected, and tumor lysates

were analyzed for the abundance of p53 and the conformationally active BAX (IP with 6A7, an antibody specifically detect active BAX, followed by BAX immunoblotting). FIG. 13C shows a model for Bcl-X_L "addiction" and sensitivity to ABT-263 in polyploid cells. Polyploidization functionally neutralizes Mcl-1 by downregulating Mcl-1 protein, inducing NOXA, increasing the interaction of NOXA with Mcl-1, or some combination of these effects. Additionally, Bcl-X_L becomes burdened by BH3-only proteins, such as tBID and BIK. This renders cell survival increasingly dependent upon Bcl-X_L. This dependence or "addiction" represents a molecular Achilles' heel of polyploidization, as ABT-263, which disables the anti-apoptotic function of Bcl-X_L, elicits rapid and robust apoptosis in polyploid tumor cells.

FIG. 14 BAK and BAX activation in tumor cell lines. D54MG, SW620, and EJ1 cells were treated as in FIG. 17B. Conformationally active BAK and BAX was immunoprecipitated and detected by immunoblotting.

FIG. 15 shows gene expression changes in the Bcl-2 network. D54MG, SW620, and HCT116 cells were treated for 72 hours with 200 nM AZD1152, 250 nM MLN8054, or 1 μM VX-680. These treatments result in the following cellular Aurora selectivities: Aurora B, Aurora A, or pan-Aurora, respectively. Gene expression changes in the Bcl-2 network were detected by microarray. These data were hierarchically clustered using a correlation similarity measure using SPOTFIRE® (TIBCO®) data analysis software.

FIG. 16 shows the identification of Bcl-X_L and Mcl-1 interactomes. FIG. 17A shows a schematic of the workflow to identify Bcl-X_L and Mcl-1 interactors is shown. HCT116 cells are either untreated or treated with 200 nM AZD1152, 1 μM ABT-263 or the combination. Endogenous Bcl-X_L and Mcl-1 is immunoprecipitated, and immunoprecipitated proteins are subjected to in-gel tryptic digestion and LC-MS/MS. The protein identified from all treatment conditions were consolidated into a single list as Bcl-X_L and Mcl-1 interactomes and applied to a manually constructed Bcl-2 network map. Interactions are indicated in green. Interactome components were subsequently confirmed by co-immunoprecipitation and immunoblotting (FIG. 17B and FIG. 17C) Bcl-X_L and Mcl-1 interactomes.

FIG. 18 shows that siRNA-mediated knockdown of Bcl-2 network components. HCT116 cells were transfected with siRNAs as indicated. 24 hours post-transfection,

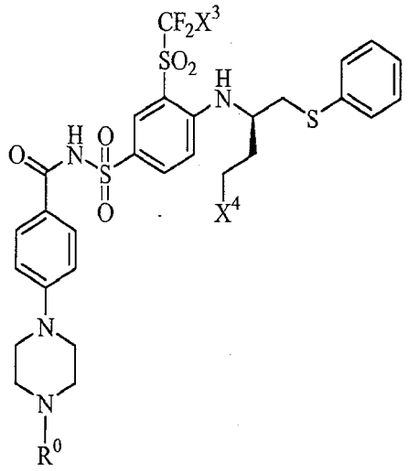
cells were treated with 200 nM AZD1152, and lysates were prepared 72 hours later and analyzed by immunoblotting. Ral-A serves as a loading control and siNT, non-targeted, control siRNA.

FIG. 19 shows that time-course of polyploidization-mediated apoptosis. HCT116 cells were treated with 200 nM AZD1152, and cell viability was determined over indicated time course.

FIG. 20 shows that Mcl-1 is epistatic to NOXA in the sensitization of polyploid cells to ABT-263. HCT116 cells (FIG. 20A) were transfected with siRNAs as indicated. 24 hours post-transfection, cells were treated with 200 nM AZD1152 for a further 72 hours. Cells were then treated for 4 hours with 1 μM ABT-263, and Caspase-3 activity was determined. HCT116 cells (FIG. 20B) were transfected with siRNAs as indicated. 24 hours post-transfection, cells were treated with 200 nM AZD1152 for a further 72 hours. Cells were then treated for 24 hours with 1 μM ABT-263, and cell viability was determined.

SUMMARY

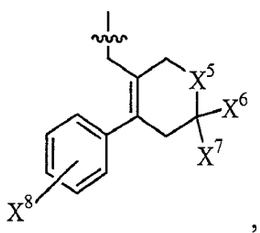
In one aspect, the present disclosure comprises compounds having formula (II)



(II),

and therapeutically acceptable salts, prodrugs, salts of prodrugs and metabolites thereof, wherein X^3 is Cl or F;

X^4 is azepan-1-yl, morpholin-1-yl, 1,4-oxazepan-4-yl, pyrrolidin-1-yl, $N(CH_3)_2$, $N(CH_3)(CH(CH_3)_2)$, 7-azabicyclo[2.2.1]heptan-1-yl or 2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]hept-5-yl, and R^0 is



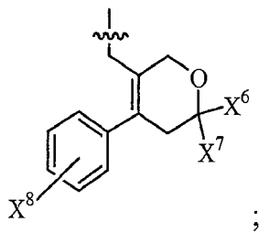
, wherein

X^5 is CH_2, $C(CH_3)_2$ or CH_2CH_2;

X^6 and X^7 are both hydrogen or are both methyl; and

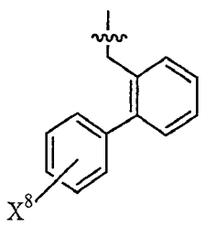
X^8 is F, Cl, Br or I; or

X^4 is azepan-1-yl, morpholin-1-yl, pyrrolidin-1-yl, $N(CH_3)(CH(CH_3)_2)$ or 7-azabicyclo[2.2.1]heptan-1-yl, and R^0 is



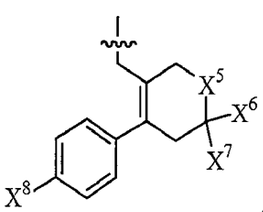
; or

X^4 is $N(CH_3)_2$ or morpholin-1-yl, and R^0 is



Another aspect comprises compounds having formula (II), and therapeutically acceptable salts, prodrugs, salts of prodrugs and metabolites thereof, wherein X^3 is Cl or F;

X^4 is azepan-1-yl, morpholin-1-yl, 1,4-oxazepan-4-yl, pyrrolidin-1-yl, $N(CH_3)_2$, $N(CH_3)(CH(CH_3)_2)$, 7-azabicyclo[2.2.1]heptan-1-yl or 2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]hept-5-yl, and R^0 is



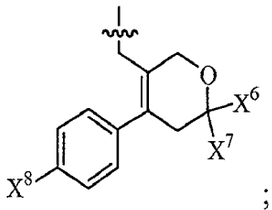
, wherein

X^5 is CH_2, $C(CH_3)_2$ or CH_2CH_2;

X^6 and X^7 are both hydrogen or are both methyl; and

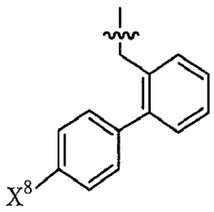
X^8 is F, Cl, Br or I; or

X^4 is azepan-1-yl, morpholin-1-yl, pyrrolidin-1-yl, $N(CH_3)(CH(CH_3)_2)$ or 7-azabicyclo[2.2.1]heptan-1-yl, and R^0 is



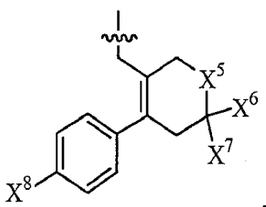
; or

X^4 is $N(CH_3)_2$ or morpholin-1-yl, and R^0 is



Still another aspect comprises compounds having formula (II), and therapeutically acceptable salts, prodrugs, salts of prodrugs and metabolites thereof, wherein X^3 is Cl or F;

X^4 is azepan-1-yl, morpholin-1-yl, 1,4-oxazepan-4-yl, pyrrolidin-1-yl, $N(CH_3)_2$, $N(CH_3)(CH(CH_3)_2)$, 7-azabicyclo[2.2.1]heptan-1-yl or 2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]hept-5-yl, and R^0 is



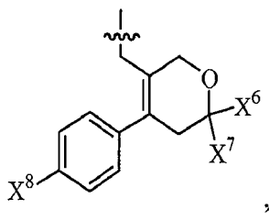
, wherein X^5 is CH_2, $C(CH_3)_2$ or CH_2CH_2, and X^6 and X^7 are both hydrogen or are both methyl; and

X^8 is F, Cl, Br or I.

Still another aspect comprises compounds having formula (II), and therapeutically acceptable salts, prodrugs, salts of prodrugs and metabolites thereof, wherein X^3 is Cl or F;

X^4 is azepan-1-yl, morpholin-1-yl, pyrrolidin-1-yl, $N(CH_3)(CH(CH_3)_2)$ or 7-azabicyclo[2.2.1]heptan-1-yl;

R^0 is



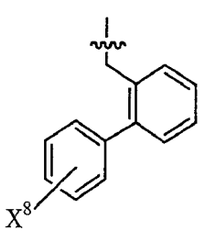
, wherein X^6 and X^7 are both hydrogen or are both methyl; and

X^8 is F, Cl, Br or I.

Still another aspect comprises compounds having formula (II), and therapeutically acceptable salts, prodrugs, salts of prodrugs and metabolites thereof, wherein X^3 is Cl or F;

X^4 is $N(CH_3)_2$ or morpholin-1-yl;

R^0 is

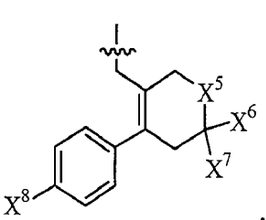


; and

X^8 is F, Cl, Br or I.

Still another aspect comprises a compound having formula (II), and therapeutically acceptable salts, prodrugs, salts of prodrugs and metabolites thereof, wherein X^3 is F; X^4 is morpholin-1-yl;

R^0 is



, wherein X^5 is $C(CH_3)_2$; X^6 and X^7 are both methyl; and

X^8 is Cl.

Still another aspect comprises

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-5,5-dimethyl-1-cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(morpholin-4-yl)-1-

((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide (alternatively referred to herein as ABT-263),

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(morpholin-4-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-1-cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(morpholin-4-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-5,5-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(isopropyl(methyl)amino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-1-cyclohepten-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(isopropyl(methyl)amino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-((1S,4S)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]hept-5-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(morpholin-4-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

4-(((1R)-3-(7-azabicyclo[2.2.1]hept-7-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]hept-5-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-5,5-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]hept-5-yl)-1-

((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-
((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-5,5-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]hept-5-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohept-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]hept-5-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohept-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]hept-5-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(isopropyl(methyl)amino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(1,4-oxazepan-4-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

4-(((1R)-3-(azepan-1-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-1-cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohept-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(dimethylamino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(dimethylamino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-5,5-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(morpholin-4-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-5,5-dimethyl-1-cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(dimethylamino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((4-(4-chlorophenyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-3-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(morpholin-4-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(isopropyl(methyl)amino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-5,5-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(isopropyl(methyl)amino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(morpholin-4-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-((1S,4S)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]hept-5-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(dimethylamino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-1-((phenylsulfanyl)methyl)-3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(dimethylamino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohept-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-1-((phenylsulfanyl)methyl)-3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-5,5-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-1-((phenylsulfanyl)methyl)-3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-1-((phenylsulfanyl)methyl)-3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohept-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-1-((phenylsulfanyl)methyl)-3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(isopropyl(methyl)amino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-1-((phenylsulfanyl)methyl)-3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

3-((chloro(difluoro)methyl)sulfonyl)-N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-1-((phenylsulfanyl)methyl)-3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)amino)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(dimethylamino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethylcyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-((1S,4S)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]hept-5-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

N-(4-(4-((4'-chloro(1,1'-biphenyl)-2-yl)methyl)-1-piperazinyl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(dimethylamino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide, and

N-(4-(4-((4'-chloro(1,1'-biphenyl)-2-yl)methyl)-1-piperazinyl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(4-morpholinyl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide,

and therapeutically acceptable salts, prodrugs, salts of prodrugs and metabolites thereof.

Still another aspect comprises compositions for treating diseases during which are expressed one or more than one of antiapoptotic Bcl-X_L protein, antiapoptotic Bcl-2 protein or antiapoptotic Bcl-w protein, said compositions comprising an excipient and a therapeutically effective amount of the compound having formula (II).

Still another aspect comprises methods of treating diseases in a patient during which are expressed one or more than one of antiapoptotic Bcl-X_L protein, antiapoptotic Bcl-2 protein or antiapoptotic Bcl-w protein, said methods comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a compound having formula (II).

Still another aspect comprises compositions comprising an excipient and a therapeutically effective amount of the compound having formula (II) for treating diseases of abnormal cell growth and/or dysregulated apoptosis, such as cancer, including, for example, mesothioloma, bladder cancer, pancreatic cancer, skin cancer, cancer of the head or neck, cutaneous or intraocular melanoma, ovarian cancer, breast cancer, uterine cancer, carcinoma of the fallopian tubes, carcinoma of the endometrium, carcinoma of the cervix, carcinoma of the vagina, carcinoma of the vulva, bone cancer, ovarian cancer, cervical cancer, colon cancer, rectal cancer, cancer of the anal region, stomach cancer, gastrointestinal (gastric, colorectal, and duodenal), chronic lymphocytic leukemia, esophageal cancer, cancer of the small intestine, cancer of the endocrine system, cancer of the thyroid gland, cancer of the parathyroid gland, cancer of the adrenal gland, sarcoma of soft tissue, cancer of the urethra, cancer of the penis, testicular cancer, hepatocellular cancer (hepatic and billiary duct), primary or secondary central nervous system tumor, primary or secondary brain tumor, Hodgkin's disease, chronic or acute leukemia, chronic myeloid leukemia, lymphocytic lymphomas, lymphoblastic leukemia, follicular lymphoma, lymphoid malignancies of T-cell or B-cell origin, melanoma,

multiple myeloma, oral cancer, ovarian cancer, non-small cell lung cancer, prostate cancer, small cell lung cancer, cancer of the kidney and ureter, renal cell carcinoma, carcinoma of the renal pelvis, neoplasms of the central nervous system, primary central nervous system lymphoma, non Hodgkin's lymphoma, spinal axis tumors, brain stem glioma, pituitary adenoma, adrenocortical cancer, gall bladder cancer, cancer of the spleen, cholangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, or a combination thereof.

Still another aspect comprises methods of treating mesothioloma, bladder cancer, pancreatic cancer, skin cancer, cancer of the head or neck, cutaneous or intraocular melanoma, ovarian cancer, breast cancer, uterine cancer, carcinoma of the fallopian tubes, carcinoma of the endometrium, carcinoma of the cervix, carcinoma of the vagina, carcinoma of the vulva, bone cancer, ovarian cancer, cervical cancer, colon cancer, rectal cancer, cancer of the anal region, stomach cancer, gastrointestinal (gastric, colorectal, and duodenal), chronic lymphocytic leukemia, esophageal cancer, cancer of the small intestine, cancer of the endocrine system, cancer of the thyroid gland, cancer of the parathyroid gland, cancer of the adrenal gland, sarcoma of soft tissue, cancer of the urethra, cancer of the penis, testicular cancer, hepatocellular cancer (hepatic and billiary duct), primary or secondary central nervous system tumor, primary or secondary brain tumor, Hodgkin's disease, chronic or acute leukemia, chronic myeloid leukemia, lymphocytic lymphomas, lymphoblastic leukemia, follicular lymphoma, lymphoid malignancies of T-cell or B-cell origin, melanoma, multiple myeloma, oral cancer, ovarian cancer, non-small cell lung cancer, prostate cancer, small cell lung cancer, cancer of the kidney and ureter, renal cell carcinoma, carcinoma of the renal pelvis, neoplasms of the central nervous system, primary central nervous system lymphoma, non Hodgkin's lymphoma, spinal axis tumors, brain stem glioma, pituitary adenoma, adrenocortical cancer, gall bladder cancer, cancer of the spleen, cholangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, or a combination of one or more of the above cancers in a patient, said methods comprising administering thereto a therapeutically effective amount of a compound having formula (II).

Still another aspect comprises compositions for treating bladder cancer, brain cancer, breast cancer, bone marrow cancer, cervical cancer, chronic lymphocytic

leukemia, colorectal cancer, esophageal cancer, hepatocellular cancer, lymphoblastic leukemia, follicular lymphoma, lymphoid malignancies of T-cell or B-cell origin, melanoma, myelogenous leukemia, myeloma, oral cancer, ovarian cancer, non-small cell lung cancer, prostate cancer, small cell lung cancer and spleen cancer, said compositions comprising an excipient and a therapeutically effective amount of the compound having formula (II).

Still another aspect comprises methods of treating bladder cancer, brain cancer, breast cancer, bone marrow cancer, cervical cancer, chronic lymphocytic leukemia, colorectal cancer, esophageal cancer, hepatocellular cancer, lymphoblastic leukemia, follicular lymphoma, lymphoid malignancies of T-cell or B-cell origin, melanoma, myelogenous leukemia, myeloma, oral cancer, ovarian cancer, non-small cell lung cancer, prostate cancer, small cell lung cancer and spleen cancer in a patient, said methods comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a compound having formula (II).

Still another aspect comprises compositions for treating diseases in a patient during which are expressed one or more than one of antiapoptotic Bcl-X_L protein, antiapoptotic Bcl-2 protein or antiapoptotic Bcl-w protein, said compositions comprising an excipient and a therapeutically effective amount of the compound having formula (II) and a therapeutically effective amount of one additional therapeutic agent or more than one additional therapeutic agent.

Still another aspect comprises methods of treating diseases in a patient during which is expressed one or more than one of antiapoptotic Bcl-X_L protein, antiapoptotic Bcl-2 protein or antiapoptotic Bcl-w protein, said methods comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a compound having formula (II) and a therapeutically effective amount of one additional therapeutic agent or more than one additional therapeutic agent.

Still another aspect comprises compositions for treating mesothioloma, bladder cancer, pancreatic cancer, skin cancer, cancer of the head or neck, cutaneous or intraocular melanoma, ovarian cancer, breast cancer, uterine cancer, carcinoma of the fallopian tubes, carcinoma of the endometrium, carcinoma of the cervix, carcinoma of the vagina, carcinoma of the vulva, bone cancer, ovarian cancer, cervical cancer, colon

cancer, rectal cancer, cancer of the anal region, stomach cancer, gastrointestinal (gastric, colorectal, and duodenal), chronic lymphocytic leukemia, esophageal cancer, cancer of the small intestine, cancer of the endocrine system, cancer of the thyroid gland, cancer of the parathyroid gland, cancer of the adrenal gland, sarcoma of soft tissue, cancer of the urethra, cancer of the penis, testicular cancer, hepatocellular cancer (hepatic and billiary duct), primary or secondary central nervous system tumor, primary or secondary brain tumor, Hodgkin's disease, chronic or acute leukemia, chronic myeloid leukemia, lymphocytic lymphomas, lymphoblastic leukemia, follicular lymphoma, lymphoid malignancies of T-cell or B-cell origin, melanoma, multiple myeloma, oral cancer, ovarian cancer, non-small cell lung cancer, prostate cancer, small cell lung cancer, cancer of the kidney and ureter, renal cell carcinoma, carcinoma of the renal pelvis, neoplasms of the central nervous system, primary central nervous system lymphoma, non Hodgkin's lymphoma, spinal axis tumors, brain stem glioma, pituitary adenoma, adrenocortical cancer, gall bladder cancer, cancer of the spleen, cholangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, or a combination of one or more of the above cancers, said compositions comprising an excipient and therapeutically effective amount of a compound having formula (II) and one additional therapeutic agent or more than one additional therapeutic agent.

Still another aspect comprises methods of treating mesothioloma, bladder cancer, pancreatic cancer, skin cancer, cancer of the head or neck, cutaneous or intraocular melanoma, ovarian cancer, breast cancer, uterine cancer, carcinoma of the fallopian tubes, carcinoma of the endometrium, carcinoma of the cervix, carcinoma of the vagina, carcinoma of the vulva, bone cancer, ovarian cancer, cervical cancer, colon cancer, rectal cancer, cancer of the anal region, stomach cancer, gastrointestinal (gastric, colorectal, and duodenal), chronic lymphocytic leukemia, esophageal cancer, cancer of the small intestine, cancer of the endocrine system, cancer of the thyroid gland, cancer of the parathyroid gland, cancer of the adrenal gland, sarcoma of soft tissue, cancer of the urethra, cancer of the penis, testicular cancer, hepatocellular cancer (hepatic and billiary duct), primary or secondary central nervous system tumor, primary or secondary brain tumor, Hodgkin's disease, chronic or acute leukemia, chronic myeloid leukemia, lymphocytic lymphomas, lymphoblastic leukemia, follicular lymphoma, lymphoid

malignancies of T-cell or B-cell origin, melanoma, multiple myeloma, oral cancer, ovarian cancer, non-small cell lung cancer, prostate cancer, small cell lung cancer, cancer of the kidney and ureter, renal cell carcinoma, carcinoma of the renal pelvis, neoplasms of the central nervous system, primary central nervous system lymphoma, non Hodgkin's lymphoma, spinal axis tumors, brain stem glioma, pituitary adenoma, adrenocortical cancer, gall bladder cancer, cancer of the spleen, cholangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, or a combination of one or more of the above cancers in a patient, said methods comprising administering thereto therapeutically effective amounts of a compound having formula (II) and one additional therapeutic agent or more than one additional therapeutic agent.

Still another aspect comprises methods of treating mesothioloma, bladder cancer, pancreatic cancer, skin cancer, cancer of the head or neck, cutaneous or intraocular melanoma, ovarian cancer, breast cancer, uterine cancer, carcinoma of the fallopian tubes, carcinoma of the endometrium, carcinoma of the cervix, carcinoma of the vagina, carcinoma of the vulva, bone cancer, ovarian cancer, cervical cancer, colon cancer, rectal cancer, cancer of the anal region, stomach cancer, gastrointestinal (gastric, colorectal, and duodenal), chronic lymphocytic leukemia, esophageal cancer, cancer of the small intestine, cancer of the endocrine system, cancer of the thyroid gland, cancer of the parathyroid gland, cancer of the adrenal gland, sarcoma of soft tissue, cancer of the urethra, cancer of the penis, testicular cancer, hepatocellular cancer (hepatic and billiary duct), primary or secondary central nervous system tumor, primary or secondary brain tumor, Hodgkin's disease, chronic or acute leukemia, chronic myeloid leukemia, lymphocytic lymphomas, lymphoblastic leukemia, follicular lymphoma, lymphoid malignancies of T-cell or B-cell origin, melanoma, multiple myeloma, oral cancer, ovarian cancer, non-small cell lung cancer, prostate cancer, small cell lung cancer, cancer of the kidney and ureter, renal cell carcinoma, carcinoma of the renal pelvis, neoplasms of the central nervous system, primary central nervous system lymphoma, non Hodgkin's lymphoma, spinal axis tumors, brain stem glioma, pituitary adenoma, adrenocortical cancer, gall bladder cancer, cancer of the spleen, cholangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, or a combination of one or more of the above cancers in a patient, said methods comprising administering thereto therapeutically effective

amounts of a compound having formula (II) and one or more than one of etoposide, vincristine, CHOP, rituximab, rapamycin, R-CHOP, bortezomib, MLN8237, tozasertib (also known as VX-680 or MK-0457), PHA-739358, AT9283, AZD1152, BI811283, ENMD-2076, CYC116, AMG900, PF-03814735, R763, SNS-314 or TAK-901.

Still another aspect comprises methods of treating B-cell lymphoma in a patient comprising administering thereto a therapeutically effective amount of a compound having formula (II) and etoposide.

Still another aspect comprises methods of treating B-cell lymphoma in a patient comprising administering thereto therapeutically effective amounts of a compound having formula (II) and vincristine.

Still another aspect comprises methods of treating B-cell lymphoma in a patient comprising administering thereto therapeutically effective amounts of a compound having formula (II) and CHOP.

Still another aspect comprises methods of treating B-cell lymphoma in a patient comprising administering thereto therapeutically effective amounts of a compound having formula (II) and rituximab.

Still another aspect comprises methods of treating B-cell lymphoma in a patient comprising administering thereto therapeutically acceptaible amounts of a compound having formula (II) and rapamycin.

Still another aspect comprises methods of treating mantle cell lymphoma in a patient comprising administering thereto therapeutically acceptable amouns of a compound having formula (II) and R-CHOP.

Still another aspect comprises methods of treating mantle cell lymphoma in a patient comprising administering thereto therapeutically effective amounts of a compound having formula (II) and bortezomib.

In still yet another aspect, the present disclosure relates to a method of treating a patient suffering from cancer. The method comprises the steps of:

a) administering to a patient suffering from cancer a therapeutically effective amount of at least one polyploidy inducing agent; and

b) administering to the patient a therapeutically effective amount of at least one Bcl-2 family protein inhibitor.

In the above method, the polyploidy inducing agent can be an Aurora Kinase inhibitor. The Aurora Kinase inhibitor can be an Aurora Kinase A inhibitor, an Aurora Kinase B inhibitor, an Aurora Kinase C inhibitor or combinations thereof. More specifically, the Aurora Kinase inhibitor is an Aurora Kinase B inhibitor. For example, the Aurora Kinase B inhibitor is AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 or Hersperadin.

In the above method, the Bcl-2 family protein inhibitor can be ABT-263, ABT-737, a Bcl-X_L selective inhibitor or combinations thereof.

In another aspect, the present disclosure relates to a combination of therapeutic agents for use in treating a patient suffering from cancer. The combination comprises:

a) at least one polyploidy inducing agent for use in inducing polyploidization in one or more cancer cells in the patient; and

b) at least one Bcl-2 family protein inhibitor.

In the above combination, the polyploidy inducing agent can be an Aurora Kinase inhibitor. The Aurora Kinase inhibitor can be an Aurora Kinase A inhibitor, an Aurora Kinase B inhibitor, an Aurora Kinase C inhibitor or combinations thereof. More specifically, the Aurora Kinase inhibitor is an Aurora Kinase B inhibitor. For example, the Aurora Kinase B inhibitor is AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 or Hersperadin.

In the above combination, the Bcl-2 family protein inhibitor can be ABT-263, ABT-737, a Bcl-X_L selective inhibitor or combinations thereof.

In yet another aspect, the present disclosure relates to method of classifying a patient for eligibility for treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor. The method comprising the steps of:

a) providing a test sample from a patient;

b) determining the presence or absence of at least one mutation in at least one gene selected from the group consisting of: a BAX gene, a BAK gene or a NOXA gene in the test sample; and

c) classifying the patient as being eligible for receiving treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a

polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor based on the presence or absence of at least one mutation as determined in step b).

In the above method, the polyploidy inducing agent can be an Aurora Kinase inhibitor. The Aurora Kinase inhibitor can be an Aurora Kinase A inhibitor, an Aurora Kinase B inhibitor, an Aurora Kinase C inhibitor or combinations thereof. More specifically, the Aurora Kinase inhibitor is an Aurora Kinase B inhibitor. For example, the Aurora Kinase B inhibitor is AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 or Hersperadin.

In the above method, the Bcl-2 family protein inhibitor can be ABT-263, ABT-737, a Bcl-X_L selective inhibitor or combinations thereof.

In the above method, the test sample can comprise a tissue sample. For example, the tissue sample comprises a peripheral blood sample, a tumor tissue or a suspected tumor tissue, a thin layer cytological sample, a fine needle aspirate sample, a bone marrow sample, a lymph node sample, a urine sample, an ascites sample, a lavage sample, an esophageal brushing sample, a bladder or lung wash sample, a spinal fluid sample, a brain fluid sample, a ductal aspirate sample, a nipple discharge sample, a pleural effusion sample, a fresh frozen tissue sample, a paraffin embedded tissue sample or an extract or processed sample produced from any of a peripheral blood sample, a tumor tissue or a suspected tumor tissue, a thin layer cytological sample, a fine needle aspirate sample, a bone marrow sample, a urine sample, an ascites sample, a lavage sample, an esophageal brushing sample, a bladder or lung wash sample, a spinal fluid sample, a brain fluid sample, a ductal aspirate sample, a nipple discharge sample, a pleural effusion sample, a fresh frozen tissue sample or a paraffin embedded tissue sample.

Moreover, in the above method, the determination step (b) can be performed by *in situ* hybridization. For example, the *in situ* hybridization can be performed with a nucleic acid probe that is fluorescently labeled. Alternatively, the *in situ* hybridization is performed with at least two nucleic acid probes. In still yet another alternative, the *in situ* hybridization is performed with a peptide nucleic acid probe.

Alternatively, in the above method, the determination step (b) can be performed by polymerase chain reaction.

In the above method, the patient may also, contemporaneously therewith, be receiving treatment with chemotherapy, radiation or combinations thereof.

In another aspect, the present disclosure relates to a method of monitoring a patient suffering from cancer and being treated with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor. The method comprises the steps of:

a) providing a test sample from a patient suffering from cancer and currently being treated with at least one polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor;

b) determining the presence or absence of at least one mutation in at least one gene selected from the group consisting of: a BAX gene, a BAK gene or a NOXA gene in the test sample; and

c) determining whether the patient should continue to be treated with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor based on the presence or absence of at least one mutation as determined in step b).

In the above method, the polyploidy inducing agent can be an Aurora Kinase inhibitor. The Aurora Kinase inhibitor can be an Aurora Kinase A inhibitor, an Aurora Kinase B inhibitor, an Aurora Kinase C inhibitor or combinations thereof. More specifically, the Aurora Kinase inhibitor is an Aurora Kinase B inhibitor. For example, the Aurora Kinase B inhibitor is AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 or Hersperadin.

In the above method, the Bcl-2 family protein inhibitor can be ABT-263, ABT-737, a Bcl-X_L selective inhibitor or combinations thereof.

In the above method, the test sample can comprise a tissue sample. For example, the tissue sample comprises a peripheral blood sample, a tumor tissue or a suspected tumor tissue, a thin layer cytological sample, a fine needle aspirate sample, a bone marrow sample, a lymph node sample, a urine sample, an ascites sample, a lavage sample, an esophageal brushing sample, a bladder or lung wash sample, a spinal fluid sample, a brain fluid sample, a ductal aspirate sample, a nipple discharge sample, a pleural effusion sample, a fresh frozen tissue sample, a paraffin embedded tissue sample

or an extract or processed sample produced from any of a peripheral blood sample, a tumor tissue or a suspected tumor tissue, a thin layer cytological sample, a fine needle aspirate sample, a bone marrow sample, a urine sample, an ascites sample, a lavage sample, an esophageal brushing sample, a bladder or lung wash sample, a spinal fluid sample, a brain fluid sample, a ductal aspirate sample, a nipple discharge sample, a pleural effusion sample, a fresh frozen tissue sample or a paraffin embedded tissue sample.

Moreover, in the above method, the determination step (b) can be performed by *in situ* hybridization. For example, the *in situ* hybridization can be performed with a nucleic acid probe that is fluorescently labeled. Alternatively, the *in situ* hybridization is performed with at least two nucleic acid probes. In still yet another alternative, the *in situ* hybridization is performed with a peptide nucleic acid probe.

Alternatively, in the above method, the determination step (b) can be performed by polymerase chain reaction.

In the above method, the patient may also, contemporaneously therewith, be receiving treatment with chemotherapy, radiation or combinations thereof.

In still yet another aspect, the present disclosure relates to a method of classifying a patient as having a cancer that is resistant to treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor, the method comprising the steps of:

a) providing a test sample from a patient suffering from cancer;

b) determining the presence or absence of at least one mutation in at least one gene selected from the group consisting of: a BAX gene, a BAK gene or a NOXA gene in the test sample; and

c) classifying the patient as having a cancer that is resistant to treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor based on the presence or absence of at least one mutation determined in step b).

In the above method, the polyploidy inducing agent can be an Aurora Kinase inhibitor. The Aurora Kinase inhibitor can be an Aurora Kinase A inhibitor, an Aurora Kinase B inhibitor, an Aurora Kinase C inhibitor or combinations thereof. More

specifically, the Aurora Kinase inhibitor is an Aurora Kinase B inhibitor. For example, the Aurora Kinase B inhibitor is AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 or Hersperadin.

In the above method, the Bcl-2 family protein inhibitor can be ABT-263, ABT-737, a Bcl-X_L selective inhibitor or combinations thereof. In the above method, the test sample can comprise a tissue sample. For example, the tissue sample comprises a peripheral blood sample, a tumor tissue or a suspected tumor tissue, a thin layer cytological sample, a fine needle aspirate sample, a bone marrow sample, a lymph node sample, a urine sample, an ascites sample, a lavage sample, an esophageal brushing sample, a bladder or lung wash sample, a spinal fluid sample, a brain fluid sample, a ductal aspirate sample, a nipple discharge sample, a pleural effusion sample, a fresh frozen tissue sample, a paraffin embedded tissue sample or an extract or processed sample produced from any of a peripheral blood sample, a tumor tissue or a suspected tumor tissue, a thin layer cytological sample, a fine needle aspirate sample, a bone marrow sample, a urine sample, an ascites sample, a lavage sample, an esophageal brushing sample, a bladder or lung wash sample, a spinal fluid sample, a brain fluid sample, a ductal aspirate sample, a nipple discharge sample, a pleural effusion sample, a fresh frozen tissue sample or a paraffin embedded tissue sample.

Moreover, in the above method, the determination step (b) can be performed by *in situ* hybridization. For example, the *in situ* hybridization can be performed with a nucleic acid probe that is fluorescently labeled. Alternatively, the *in situ* hybridization is performed with at least two nucleic acid probes. In still yet another alternative, the *in situ* hybridization is performed with a peptide nucleic acid probe.

Alternatively, in the above method, the determination step (b) can be performed by polymerase chain reaction.

In the above method, the patient may also, contemporaneously therewith, be receiving treatment with chemotherapy, radiation or combinations thereof.

DETAILED DESCRIPTION

In one aspect, the present disclosure relates to the discovery of a synergistic effect that occurs in tumor and cancer cells when these cells are administered a therapeutically

effective amount of at least one polyploidy inducing agent and a therapeutically effective amount of at least one Bcl-2 family protein inhibitor. Specifically, the inventors of the present disclosure discovered that the induction of polyploidization in certain tumor and cancer cells makes or renders the survival of these resulting polyploidy cells dependent on the anti-apoptotic activity of Bcl-X_L. More specifically, inducing polyploidy in these tumor and cancer cells sensitizes these cells to Bcl-X_L inhibition. Thus, the inventors have discovered a polyploidy-mediated method for inducing apoptosis or cell death in these cells. This method involves administering to a patient suffering from cancer a combination of therapeutic agents. Specifically, the patient is administered at least one polyploidy inducing agent. The purpose of the polyploidy inducing agent is to induce polyploidy in one or more cancer cells. As mentioned previously herein, after induction of polyploidy, the survival of these polyploid tumor and cancer cells is dependent on Bcl-X_L. Apoptosis or death of these polyploidy tumor and cancer cells can be obtained or achieved by administering to the patient at least one Bcl-2 family protein inhibitor. The order in which the at least one polyploidy inducing agent and the at least one Bcl-2 family protein inhibitor are administered is not critical. However, because tumor and cancer cells do not become sensitized to Bcl-2 family protein inhibitors until after the induction of polyploidy, it is preferred to administer the at least one polyploidy inducing agent to the patient prior to or along with the at least one Bcl-2 family protein inhibitor. In connection with the above discovery, the inventors of the present disclosure also discovered that tumor and cancer cells (regardless of whether or not these cells are induced to be polyploid or not) which contain at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene are immune or exhibit resistance to treatment with a Bcl-2 family protein inhibitor after induction of polyploidy (such as with at least one polyploidy inducing agent). In other words, polyploid tumor and cancer cells which contain at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and human NOXA gene do not exhibit or

experience apoptosis or cell death when simultaneously or subsequently treated with at least one Bcl-2 family protein inhibitor.

Thus, in view of this further discovery, in another aspect, the present disclosure also provides methods and compositions for monitoring cancer and tumor cells for resistance to polyploidy inducing agent (such as an Aurora Kinase inhibitor) therapy, Bcl-2 family protein inhibitor therapy or a combination of polyploidy inducing agent and Bcl-2 family protein inhibitor therapy. The disclosure provides diagnostic assays for identifying, classifying and monitoring cancer patients which comprises assessing a test sample for the presence or absence of at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene. The inventive assays include assay methods for identifying patients eligible to receive a polyploidy inducing agent, Bcl-2 family protein inhibitor therapy or a polyploidy inducing agent and Bcl-2 family protein inhibitor therapy (as a combination therapy together or together with yet another therapy (e.g., such as with chemotherapy, radiation or combinations thereof) and for monitoring patient response to such therapy. The disclosure comprises, for example, determining by fluorescent *in situ* hybridization the presence or absence of at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene. The methods herein can be performed prior to the induction of polyploidy or after the induction of polyploidy. Patients classified as having one or mutations or an increase in one or more mutations over a baseline (or predetermined) level in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene would be considered to be ineligible to receive at least one polyploidy inducing agent, at least one Bcl-2 family protein inhibitor or the combination therapy of a polyploidy inducing agent and Bcl-2 family protein inhibitor therapy because such patients would be considered to be less likely to respond to each of these therapies.

Specifically, patients who are identified as having one or more mutations in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene are believed to be immune, resistant or less sensitized to treatment with at least one Bcl-2 family protein inhibitor before treatment with or after treatment with at least one polyploidy inducing agent (to induce polyploidization).

In one aspect, the disclosure comprises a method for identifying or classifying a patient as eligible for treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or with a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor (either together or in combination with a third therapy). The method comprising the steps of:

(a) providing a tissue sample from a patient;

(b) determining the presence or absence of at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene; and

(c) classifying the patient as being eligible for treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or both a polyploidy inducing agent and Bcl-2 family protein inhibitor based on the presence or absence of at least one mutation in a (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene. In the above method, a patient would be ineligible for treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or both a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor based on the presence of at least one mutation or an increase in the number of one or more mutations over a baseline (or predetermined) level in a (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene. As with the methods mentioned previously herein, this method can be performed before or after induction of polyploidy in the patient.

In this aspect, the cancer can be any type of cancer, such as colorectal carcinoma or pancreatic cancer. Moreover, in this aspect, the gene amplification can be determined by a multi-color fluorescent *in situ* hybridization (FISH) assay, for example, performed on a lung cancer tumor biopsy sample. In other aspects, the quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) method is used.

In yet another aspect, the disclosure comprises a method for identifying or classifying a patient having a cancer that is resistant to therapy with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor, or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor, the method comprising the steps of:

(a) providing a test sample (*e.g.*, such as a tissue sample) from a patient;

(b) determining the presence or absence of at least one mutation in a (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene; and

(c) classifying the patient as having a cancer that is resistant to a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor based on the presence of at least one mutation in a (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene. As with the methods mentioned previously herein, this method can be performed before or after induction of polyploidy in the patient.

In this aspect, the cancer can be any type of cancer, such as colorectal carcinoma or pancreatic cancer. Moreover, in this aspect, the gene amplification can be determined by a multi-color fluorescent *in situ* hybridization (FISH) assay, for example, performed on a lung cancer tumor biopsy sample. In other aspects, the polymerase chain reaction (PCR) is used.

In still yet another aspect, the disclosure is directed to methods for monitoring a patient being treated with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor, the method comprising the steps of:

(a) providing a test sample from a cancer patient being treated with at least one polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor (optionally, tumor or cancer cells obtained from a tissue sample can be identified or extracted);

(b) determining in the test sample (for example, in the tumor or cancer cells) the presence or absence of at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene; and

(c) comparing the number of mutations in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene from the test sample (such as in the tumor or cancer cells) against a baseline level or a predetermined level; and

(d) determining whether the patient should continue to be treated with the polyploidy inducing agent, Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and Bcl-2 family protein inhibitor based on the comparison in step (c). As with the methods mentioned previously herein, this method can be performed before or after induction of polyploidy in the patient.

The comparison (or informational analysis) of the number of one or more mutations determined from the test sample with the baseline or predetermined level can be done by an automated system, such as a software program or intelligence system that is part of, or compatible with, the equipment (e.g., computer platform) on which the assay is carried out. Alternatively, this comparison or informational analysis can be done by a physician.

Specifically, if the test sample (*e.g.*, the tumor or cancer cells) having at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene is the same as or higher then the baseline level or predetermined level, then treatment with the polyploidy inducing agent, Bcl-2 family protein inhibitor or

combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor can be discontinued, stopped or terminated. Alternatively, the treating physician may decide to combine the polyploidy inducing agent with at least a second therapy (for example, treatment with a second small molecule) as a combination therapy. Still further alternatively, the treating physician may decide to combine the Bcl-2 family protein inhibitor with at least a second therapy (for example, treatment with a second small molecule) as a combination therapy. However, if at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene is less then the baseline level or the predetermined level or if no mutations are detected in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene then treatment with the polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor can be continued. Again, depending on the results obtained with said treatment, the treating physician may decide to combine the polyploidy inducing agent with at least a second therapy (for example, treatment with a second small molecule) as a combination therapy. Alternatively, depending on the results obtained with said treatment, the treating physician may decide to combine the Bcl-2 family protein inhibitor therapy with at least a second therapy (for example, treatment with a second small molecule).

Again, FISH and PCR methods can be used to detect the presence or absence of at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene in a test sample obtained from a patient.

The disclosure is also directed to kits that package, for example, oligo- or polynucleotides engineered to be used as PCR primers, FISH probes, *etc.*

The disclosure has significant capability to provide improved stratification of patients for cancer therapy, and in particular for polyploidy inducing agent therapy, Bcl-2

family protein inhibitor therapy or a combination of polyploidy inducing agent therapy and Bcl-2 family protein inhibitor therapy. The assessment of these biomarkers according to the present disclosure also allows tracking of individual patient response to the therapy.

A. Definitions

Section headings as used in this section and the entire disclosure herein are not intended to be limiting.

As used herein, the singular forms "a," "an" and "the" include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. For the recitation of numeric ranges herein, each intervening number there between with the same degree of precision is explicitly contemplated. For example, for the range 6-9, the numbers 7 and 8 are contemplated in addition to 6 and 9, and for the range 6.0-7.0, the numbers 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 and 7.0 are explicitly contemplated.

a) Antitumorigenesis

As used herein, the term "antitumorigenesis," refers to a reduction of tumor growth.

b) Aurora Kinase Inhibitor

An "Aurora Kinase inhibitor" refers to a therapeutic compound of any type (e.g., non-selective or selective), including small molecule, antibody, antisense, small interfering RNA, or microRNA-based compounds, that binds to at least one of Aurora Kinase A, Aurora A, Aurora Kinase B, Aurora B, Aurora Kinase C or Aurora C, and antagonizes the activity of at least one Aurora Kinase A, Aurora A, Aurora Kinase B, Aurora B, Aurora Kinase C or Aurora C related nucleic acid or protein.

c) Aurora Kinase A Inhibitor

An "Aurora Kinase A inhibitor" refers to a therapeutic compound of any type (e.g., non-selective or selective), including small molecule, antibody, antisense, small interfering RNA, or microRNA-based compounds, that binds to at least one of Aurora Kinase A or Aurora A, and antagonizes the activity of the Aurora Kinase A or Aurora A related nucleic acid or protein. The methods of the present disclosure are useful with any

known or hereafter developed Aurora Kinase A inhibitor. Examples of an Aurora Kinase A inhibitor are PHA-739358, MLN-8054, R-763, JNJ-7706621, MP-529 and MP-235.

d) Aurora Kinase B Inhibitor

An "Aurora Kinase B inhibitor" refers to a therapeutic compound of any type (e.g., non-selective or selective), including small molecule, antibody, antisense, small interfering RNA, or microRNA-based compounds, that binds to at least one of Aurora Kinase B or Aurora B, and antagonizes the activity of the Aurora Kinase B or Aurora B related nucleic acid or protein. For example, a number of Aurora Kinase B inhibitors are known to inhibit at least one of histone H3 phosphorylation or cell division. In addition, a number of Aurora Kinase B inhibitors are known to induce apoptosis in at least one cell system (such as an acute myeloid leukemia cell line, a primary acute myeloid leukemia culture, *etc.*). The methods of the present disclosure are useful with any known or hereafter developed Aurora Kinase B inhibitor. Examples of an Aurora Kinase B inhibitor are AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 and Hesperadin.

AZD1152, also known as, 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-Fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1*H*-pyrazol-3-yl)amino]-quinazolin-7-yl}oxy)propyl](ethyl)amino]ethyl dihydrogen phosphate, is a prodrug of a pyrazoloquinazoline Aurora Kinase inhibitor (AZD1152-hydroxyquinazoline pyrazol anilide (HQPA)) and is converted rapidly to the active AZD1152-HQPA in plasma (See, Mortlock, AA, et al., *J. Med. Chem.,* 50:2213-24 (2007)). AZD1152-HQPA is a highly potent and selective inhibitor of Aurora B.

ZM447439, also known as 4-(4-(*N*-benzoylamino)anilino)-6-methoxy-7-(3-(1-morpholino)propoxy)quinazoline, is a quinazoline derivative, inhibits Aurora A and Aurora B. The chemical structure of ZM447439 is provided in Ditchfield, C., et al., *J. Cell Bio.,* 161(2):267-280 (2003) and Montembault, E., et al., *Drugs of the Future*, 30(1):1-9 (2005).

VX-680/MK0457 is a cyclopropane carboxylic acid of {4-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-6-(5-methyl-2H-pyrazol-3-ylamino)-pyrimidin-2-ylsulphanyl]-phenyl}-amide and inhibits Aurora A, Aurora B and Aurora C. The chemical structure of VX-680/MK0457 is provided in Montembault, E., et al., *Drugs of the Future*, 30(1):1-9 (2005).

Hesperadin, an indolinone, inhibits Aurora B. The chemical structure of Hesperadin is provided in Hauf, S., et al.; *J. Cell Bio.,* 161(2):281-294 (2003) and Montembault, E., et al., *Drugs of the Future*, 30(1):1-9 (2005).

e) Aurora Kinase C Inhibitor

An "Aurora Kinase C inhibitor" refers to a therapeutic compound of any type (e.g., non-selective or selective), including small molecule, antibody, antisense, small interfering RNA, or microRNA-based compounds, that binds to at least one of Aurora Kinase C or Aurora C, and antagonizes the activity of the Aurora Kinase C or Aurora C related nucleic acid or protein. The methods of the present disclosure are useful with any known or hereafter developed Aurora Kinase C inhibitor. Examples of an Aurora Kinase C inhibitor are AZD1152 and VX-680/MK-0457.

f) Consisting Essentially of a Polynucleotide Having a % Sequence Identity

"Consisting essentially of a polynucleotide having a % sequence identity" means that the polynucleotide does not substantially differ in length, but may differ substantially in sequence. Thus, a polynucleotide "A" consisting essentially of a polynucleotide having at least 80% sequence identity to a known sequence "B" of 100 nucleotides means that polynucleotide "A" is about 100 nucleotides (nts) long, but up to 20 nts can vary from the "B" sequence. The polynucleotide sequence in question can be longer or shorter due to modification of the termini, such as, for example, the addition of 1-15 nucleotides to produce specific types of probes, primers and other molecular tools, *etc.*, such as the case of when substantially non-identical sequences are added to create intended secondary structures. Such non-identical nucleotides are not considered in the calculation of sequence identity when the sequence is modified by "consisting essentially of."

g) Bcl-2

As used herein, the term "Bcl-2" refers to a family of pro- and anti-apoptotic proteins that constitute a critical control point for apoptosis. Members of this family include both pro- and anti-apoptotic proteins and share homology in up to four conserved

regions termed Bcl-2 homology (BH) 1-4 domains. The family can be divided into three main sub-classes: anti-apoptotic proteins, pro-apoptotic proteins, "BH3-only" proteins.

The anti-apoptotic proteins, which include Bcl-2 and Bcl-X_L, are all "multidomain," sharing homology throughout all four BH domains. However, the pro-apoptotic proteins can be further subdivided and include multidomain proteins, such as BAX and BAK, which possess sequence homology in BH1-3 domains. The more distantly related "BH3-only" proteins are to date all pro-apoptotic and share sequence homology within the amphipathic α-helical BH3 region, which is required for their apoptotic function.

The human BAK gene encoding human BAK has Accession no. U23765, and is described in Chittenden et al. *Nature* 374:733-736 (1995). The human BAK-2 gene has Accession no. U16812, and is described in Kiefer et al., *Nature* 374:736-739 (1995). The human BAX genes encoding human BAX have Accession nos. L22475, L22474 and L22473, and are described in Oltvai et al., *Cell* 74:609-619 (1993).

As used herein, the phrase "human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene" refers to a gene that encodes at least one human Bcl-2 pro-apoptotic protein or fragment thereof such as, for example, human BAK or human BAX.

The "BH3-only proteins" constitute the third subset of the Bcl-2 family and include, for example, BID, NOXA, PUMA, BIK, BIM and BAD. These proteins share sequence homology only in the amphipathic -helical BH3 region which mutation analysis indicated is required in pro-apoptotic members for their death activity.

The human BID gene encoding human BID has Accession no. NM_197966, NM_197967, NM_001196 and is described in Genbank. The human NOXA gene encoding human NOXA has Accession no. NM_021127 and is described in Genbank. The human PUMA gene encoding human PUMA has Accession no. NM_001127242, NM_001127241, NM_001127240, NM_014417 and is described in Genbank. The human BIK gene encoding human BIK has Accession no. NM_001197 and is described in Genbank. The human BIM gene encoding human BIM has Accession no. NM_138621, NM_207002, NM_006538, BC033694, AY305714, AY305716, AY423443, AY423442, AY423441 and is described in Genbank. The human BAD gene

encoding human BAD has Accession no. NM_032989, NM_004322, BC095431 and is described in Genbank.

As used herein, the phrase, "human BH3 encoding gene" refers to a gene that encodes at least one human Bcl-2 BH3-only protein or fragment thereof, such as, for example, human BID, human NOXA, human PUMA, human BIK, human BIM and human BAD.

h) Bcl-2 Family Protein Inhibitor, Bcl-2 Family Inhibitor or Inhibitor of a Bcl-2 Family Protein

As used herein, the phrases "Bcl-2 Family Protein Inhibitor", "Bcl-2 Family Inhibitor" or "Inhibitor of a Bcl-2 Family Protein" as used interchangeably herein, refer to a therapeutic compound of any type (e.g., non-selective or selective), including small molecule-, antibody-, antisense-, small interfering RNA, or microRNA-based compounds, that binds and antagonizes or inhibits the activity of at least one gene or protein of the Bcl-2 family that governs mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) and is anti-apoptotic (such as Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Bcl-B, BFL-1 and MCI-1). Examples of Bcl-2 family protein inhibitors include the compounds described in Section B herein (namely, ABT-263 (which is N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-5,5-dimethyl-1-cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(morpholin-4-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide)), ABT-737 (N-(4-(4-((4'-chloro(1,1'-biphenyl)-2-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(dimethylamino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-nitrobenzenesulfonamide, described in published US Patent Application Nos. 20050159427 and 20060128706, Bcl-X_L inhibitors \ and combinations thereof.

i) Bcl-X_L selective inhibitor(s)

As used herein, the phrase "Bcl-X_L selective inhibitor(s)", refers to a Bcl-X_L inhibitor that exhibits a selectivity for Bcl-X_L over Bcl-2. Methods for determining whether a Bcl-X_L inhibitor is a Bcl-X_L selective inhibitor are well known in the art. Specifically, such methods involve determining the inhibition constants (Ki) for the Bcl-X_L inhibitor compounds and the binding selectivity ratio (for example, Bcl-X_L K_i:Bcl-2 K_i). The inhibition constant (Ki) is the dissociation constant of an enzyme-inhibitor

complex or a protein/small molecule complex, wherein the small molecule is inhibiting binding of one protein to another protein or peptide. Inhibition constants can be determined using Time Resolved-Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET) assay. Where the K_i for a compound is represented as ">" (greater than) a certain numerical value, it is intended to mean that the binding affinity value (e.g., for Bcl-X_L) is greater than that determined in the assay. Where the binding selectivity ratio for a compound is represented as ">" (greater than) a certain numerical value, it is intended to mean that the selectivity of a particular compound for Bcl-XL over Bcl-2 is at least as great as the number indicated. Where the K_i for a compound is represented as "<" (less than) a certain numerical value, it is intended to mean that the binding affinity value (e.g., for Bcl-2) is lower than the limit of detection of the assay used. Inhibition constants were determined using Wang's equation (Wang Zx,. An Exact Mathematical Expression For Describing Competitive Binding Of Two Different Ligands To A Protein Molecule. *FEBS Lett.* 1995, 360:111-4).

j) Expression, Antisense Inhibition and Co-Suppression

"Expression" refers to the production of a functional end-product. Expression of a gene involves transcription of the gene and translation of the mRNA into a precursor or mature protein. "Antisense inhibition" refers to the production of antisense RNA transcripts capable of suppressing the expression of the target protein. "Co-suppression" refers to the production of sense RNA transcripts capable of suppressing the expression of identical or substantially similar foreign or endogenous genes (U.S. Patent No. 5,231,020).

k) Isolated

As used herein, the term "isolated" in the context of nucleic acid molecules or polynucleotides refers to a nucleic acid molecule or polynucleotide which is separated from other nucleic acid molecules or polynucleotides which are present in the natural source of the nucleic acid molecule or polynucleotide. Moreover, an "isolated" nucleic acid molecule or polynucleotide, such as a cDNA molecule, can be substantially free of other cellular material, or culture medium when produced by recombinant techniques, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. In one aspect, nucleic acid molecules or polynucleotides are isolated.

l) Gene

"Gene" refers to a nucleic acid fragment that expresses a specific protein, including regulatory sequences preceding (5' non-coding sequences) and following (3' non-coding sequences) the coding sequence.

m) Inhibition Constant or Ki

As used herein, "inhibition constant" or "Ki" refers the dissociation constant of an enzyme-inhibitor complex or a protein/small molecule complex, wherein the small molecule is inhibiting binding of one protein to another protein. A large Ki value indicates a low binding affinity, and a small Ki value indicates a high binding affinity. Ki can be determined using any method known in the art, such as by using Wang's equation (Wang Z X,. An Exact Mathematical Expression For Describing Competitive Binding Of Two Different Ligands To A Protein Molecule. *FEBS Lett.* 1995; 360:111-4). A typical measure of binding affinity of an anti-apoptotic protein inhibitor is the balance between the binding and dissociation processes between the protein and the inhibitor (Ki).

n) Native Gene and Chimeric Construct

"Native gene" refers to a gene as found in nature with its own regulatory sequences. In contrast, "chimeric construct" refers to a combination of nucleic acid fragments that are not normally found together in nature. Accordingly, a chimeric construct may comprise regulatory sequences and coding sequences that are derived from different sources, or regulatory sequences and coding sequences derived from the same source, but arranged in a manner different than that normally found in nature.

o) Percent (%) Nucleic Acid Sequence Identity

"Percent (%) nucleic acid sequence identity" with respect to nucleic acid sequences is defined as the percentage of nucleotides in a candidate sequence that are identical with the nucleotides in the sequence of interest, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Alignment for purposes of determining % nucleic acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or Megalign (DNASTAR)

software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared.

When nucleotide sequences are aligned, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) can be calculated as follows:

% nucleic acid sequence identity = W/Z*100

where

W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program's or algorithm's alignment of C and D

and

Z is the total number of nucleotides in D.

When the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C.

p) Polymerase Chain Reaction or PCR

"Polymerase Chain Reaction" or "PCR", a technique for the synthesis of large quantities of specific DNA segments, consists of a series of repetitive cycles (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Typically, the double stranded DNA is heat-denatured, the two primers complementary to the 3' boundaries of the target segment are annealed at low temperature and then extended at an intermediate temperature. One set of these three consecutive steps is referred to as a cycle.

PCR is a powerful technique used to amplify DNA millions of fold, by repeated replication of a template, in a short period of time. ((Mullis, K., et al., *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-73 (1986)); European Patent Application No. 50,424; European Patent Application No. 84,796; European Patent Application No. 258,017, European Patent Application No. 237,362; European Patent Application No. 201,184, U.S. Patent No. 4,683,202; U.S. Patent No. 4,582,788; and U.S. Patent No. 4,683,194).

The process uses sets of specific *in vitro* synthesized oligonucleotides to prime DNA synthesis. The design of the primers is dependent upon the sequences of DNA that are to be analyzed. The technique is carried out through many cycles (usually 20-50) of melting the template at high temperature, allowing the primers to anneal to complementary sequences within the template and then replicating the template with DNA polymerase.

The products of PCR reactions can be analyzed by separation in agarose gels followed by ethidium bromide staining and visualization with UV transillumination. Alternatively, radioactive dNTPs can be added to the PCR in order to incorporate label into the products. In this case the products of PCR are visualized by exposure of the gel to x-ray film. The added advantage of radiolabeling PCR products is that the levels of individual amplification products can be quantitated.

q) Polynucleotide

A "polynucleotide" is a nucleic acid polymer of ribonucleic acid (RNA), deoxyribonucleic acid (DNA), modified RNA or DNA, or RNA or DNA mimetics (such as PNAs), and derivatives thereof, and homologues thereof. Thus, polynucleotides include polymers composed of naturally occurring nucleic bases, sugars and covalent inter-nucleoside (backbone) linkages as well as polymers having non-naturally-occurring portions that function similarly. Such modified or substituted nucleic acid polymers are well known in the art and are referred to as "analogues." Oligonucleotides are generally short polynucleotides from about 10 to up to about 160 or 200 nucleotides.

Polynucleotides also comprise primers that specifically hybridize to target sequences, including analogues and/or derivatives of the nucleic acid sequences, and homologues thereof.

Polynucleotides can be prepared by conventional techniques, such as solid-phase synthesis using commercially available equipment, such as that available from Applied Biosystems USA Inc. (Foster City, CA; USA), DuPont, (Wilmington, DE; USA), or Milligen (Bedford, MA; USA). Modified polynucleotides, such as phosphorothioates and alkylated derivatives, can also be readily prepared by similar methods known in the art (See, U.S. Patent Nos. 4,948,882, 5,464,746, and 5,424,414).

r) Polynucleotide Analogues

As used herein, the term "polynucleotide analogues" refers to polymers having modified backbones or non-natural inter-nucleoside linkages. Modified backbones include those retaining a phosphorus atom in the backbone, such as phosphorothioates, chiral phosphorothioates, phosphorodithioates, phosphotriesters, aminoalkylphosphotriesters, methyl and other alkyl phosphonates, as well as those no longer having a phosphorus atom, such as backbones formed by short chain alkyl or cycloalkyl inter-nucleoside linkages, mixed heteroatom and alkyl or cycloalkyl inter-nucleoside linkages, or one or more short chain heteroatomic or heterocyclic inter-nucleoside linkages. Modified nucleic acid polymers (analogues) can contain one or more modified sugar moieties.

Analogs that are RNA or DNA mimetics, in which both the sugar and the inter-nucleoside linkage of the nucleotide units are replaced with novel groups, are also useful. In these mimetics, the base units are maintained for hybridization with the target sequence. An example of such a mimetic, which has been shown to have excellent hybridization properties, is a peptide nucleic acid (PNA) (See, Buchardt, O., P. Nielsen, and R. Berg. 1992. *Peptide Nucleic Acids*).

s) Polyploidy Inducing Agent

As used herein, the phrase "polyploidy inducing agent" refers to a therapeutic compound of any type (e.g., non-selective or selective), including small molecule, antibody, antisense, small interfering RNA, or microRNA-based compounds, that induce polyploidy in one or more cells. Methods for determining the induction or evidence of polyploidy in one or more cells can be obtained using routine techniques known in the art. For example, evidence of polyploidy can be determined by detecting elevated expression of p53. p53 is a surrogate for polyploidization in cells harboring wildtype p53 (See, Gizatullin, F. et al., "The Aurora Kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function," *Cancer Res.* 66, 7668-77. (2006)). Additionally, cells in which polyploidy has been induced exhibit a gross morphological increase in cell size and multinucleation, both of which can be detected using routine techniques known in the art.

Examples of polyploidy inducing agents, include, but are not limited to, Aurora Kinase inhibitors, microtubule inhibitors (such as, for example, Taxotere, vincristine, nocodazole, paclitaxel or colcemid), pan-kinase inhibitors (such as, for example, staurosporine), oncolytic viruses (such as, for example, ONYX-015), Acridine orange, Dolastain-10, Noscapine, toposiomerase II inhibitors (such as, for example, ICRF-187 or ICRF-193), 2-{4-[(7-chloro-2-quinoxalinyl)oxy]phenoxy}propionic acid, 2-{4-[(7-bromo-2-quinolinyl)oxy]phenoxy}propionic acid, Platycodin D, microtubule poisons (such as, for example, JG-03-14), actin polymerization inhibitors (such as, for example, Cytochalasin B), Bistramide A or antitumor antibiotics (such as, for example, Mithramycin SKI).

t) Predetermined Level

As used herein, the term "predetermined level" refers generally to an assay cut-off value that is used to assess diagnostic results by comparing the assay results against the predetermined level, and where the predetermined level already has been linked or associated with various clinical parameters (*e.g.*, assessing risk, severity of disease, progression/non-progression/improvement, determining the age of a test sample, determining whether a test sample (*e.g.*, serum or plasma) has hemolyzed, *etc.*). An example of a predetermined level that can be used is a baseline level obtained from one or more subjects that may optionally be suffering from one or more diseases or conditions. It is well known that cutoff values may vary dependent on the nature of the assay. It further is well within the ordinary skill in the art to adapt the disclosure herein for other assays to obtain assay-specific cut-off values for those other assays based on this description.

u) Primer or Probe

A "probe" or "primer" as used herein is a polynucleotide that is at least 8 nucleotides in length and forms a hybrid structure with a target sequence, due to complementarity of at least one sequence in the probe or primer with a sequence in the target region. The polynucleotide regions of the probe can be composed of DNA and/or RNA and/or synthetic nucleotide analogs. Preferably, the probe does not contain a sequence that is complementary to the sequence or sequences used to prime for a target sequence during the polymerase chain reaction.

v) Recombinant

"Recombinant" refers to an artificial combination of two otherwise separated segments of sequence, *e.g.*, by chemical synthesis or by the manipulation of isolated segments of nucleic acids by genetic engineering techniques.

w) Specifically hybridize

"Specifically hybridize" refers to the ability of a nucleic acid to bind detectably and specifically to a second nucleic acid. Polynucleotides specifically hybridize with target nucleic acid strands under hybridization and wash conditions that minimize appreciable amounts of detectable binding by non-specific nucleic acids.

x) Stringency or Stringent Conditions

The specificity of single stranded DNA to hybridize complementary fragments is determined by the stringency of the reaction conditions. Hybridization stringency increases as the propensity to form DNA duplexes decreases. In nucleic acid hybridization reactions, the stringency can be chosen to favor specific hybridizations (high stringency). Less-specific hybridizations (low stringency) can be used to identify related, but not exact, DNA molecules (homologous, but not identical) or segments.

DNA duplexes are stabilized by: (1) the number of complementary base pairs, (2) the type of base pairs, (3) salt concentration (ionic strength) of the reaction mixture, (4) the temperature of the reaction, and (5) the presence of certain organic solvents, such as formamide, which decrease DNA duplex stability. A common approach is to vary the temperature: higher relative temperatures result in more stringent reaction conditions (See, Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, et al. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York) provide an excellent explanation of stringency of hybridization reactions.

Hybridization under "stringent conditions" means hybridization protocols in which nucleotide sequences at least 60% homologous to each other remain hybridized. Polynucleotides can include other appended groups such as peptides (*e.g.*, for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across the cell membrane. In addition, oligonucleotides can be modified with hybridization-triggered cleavage agents (See, van der Krol et al., *Biotechniques*. 6:958-76 (1988) or intercalculating agents (Zon,

G., *Pharm Res.* 5:539-49 (1988)). The oligonucleotide can be conjugated to another molecule, *e.g.*, a peptide, a hybridization triggered cross-linking agent, a transport agent, a hybridization-triggered cleavage agent, and the like.

y) Subject(s) or Patient(s)

As used herein, the terms "subject" and "patient" are used interchangeably irrespective of whether the subject has or is currently undergoing any form of treatment. As used herein, the terms "subject" and "subjects" refer to any vertebrate, including, but not limited to, a mammal (*e.g.*, cow, pig, camel, llama, horse, goat, rabbit, sheep, hamsters, guinea pig, cat, dog, rat, and mouse, a non-human primate (for example, a monkey, such as a cynomolgous monkey, chimpanzee, *etc*) and a human). Preferably, the subject is a human. Subjects or patients can be living or expired.

z) Target Sequence or Target Nucleic Acid Sequence

"Target sequence" or "target nucleic acid sequence" means a nucleic acid sequence encompassing, for example, a gene, or complements or fragments thereof, that is amplified, detected, or both using a polynucleotide primer or probe. Additionally, while the term target sequence sometimes refers to a double stranded nucleic acid sequence; a target sequence can also be single-stranded. In cases where the target is double-stranded, polynucleotide primer sequences preferably amplify both strands of the target sequence. A target sequence can be selected that is more or less specific for a particular organism. For example, the target sequence can be specific to an entire genus, to more than one genus, to a species or subspecies, serogroup, auxotype, serotype, strain, isolate or other subset of organisms.

aa) Test sample

"Test sample" means a sample taken from a subject, or a biological fluid, wherein the sample may contain a target sequence. A test sample can be taken from any source, for example, tissue, blood, saliva, sputa, mucus, sweat, urine, urethral swabs, cervical swabs, urogenital or anal swabs, conjunctival swabs, ocular lens fluid, cerebral spinal fluid, *etc.* A test sample can be used (i) directly as obtained from the source; or (ii) following a pre-treatment to modify the character of the sample. Thus, a test sample can be pre-treated prior to use by, for example, preparing plasma or serum from blood,

disrupting cells or viral particles, preparing liquids from solid materials, diluting viscous fluids, filtering liquids, adding reagents, purifying nucleic acids, *etc.*

bb) Therapeutically Effective Amount

The term "therapeutically effective amount" means an amount of drug, which is effective for producing a desired therapeutic effect upon administration to a patient, for example, to stem the growth, or result in the shrinkage, of a cancerous tumor or to produce the death of a cancerous cell or tumor.

cc) "Time Resolved-Fluorescence Resonance Energy Transfer"

As used herein, the phrase "Time Resolved-Fluorescence Resonance Energy Transfer" or "TR-FRET" refers to an assay that unites the principles of TRF (Time-Resolved Fluorescence) and FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). A number of TR-FRET assays are known and commercially available in the art. An example of a TR-FRET that can be used in the present invention is described below.

Probe Synthesis

All reagents described below for use can be obtained from the vendor unless otherwise specified. Peptide synthesis reagents including diisopropylethylamine (DIEA), dichloromethane (DCM), N-methylpyrrolidone (NMP), 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU), N-hydroxybenzotriazole (HOBt) and piperidine can be obtained from Applied Biosystems, Inc. (ABI), Foster City, CA or American Bioanalytical, Natick, MA. Preloaded 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) amino acid cartridges (Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmor-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH) can be obtained from ABI or Anaspec, San Jose, CA. The peptide synthesis resin (Fmoc-Rink amide MBHA resin) and Fmoc-Lys(Mtt)-OH can be obtained from Novabiochem, San Diego, CA. Single-isomer 6-carboxyfluorescein succinimidyl ester (6-FAM-NHS) can be obtained from Anaspec. Trifluoroacetic acid (TFA) can be obtained from Oakwood Products, West Columbia, SC. Thioanisole, phenol, triisopropylsilane (TIS), 3,6-dioxa-1,8-octanedithiol (DODT) and isopropanol can be

obtained from Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI. Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectra (MALDI-MS) can be recorded on an Applied Biosystems Voyager DE-PRO MS). Electrospray mass-spectra (ESI-MS) can be recorded on Finnigan SSQ7000 (Finnigan Corp., San Jose, CA) in both positive and negative ion mode.

General Procedure For Solid-Phase Peptide Synthesis (SPPS)

Peptides can be synthesized with, at most, 250 μmol preloaded Wang resin/vessel on an ABI 433A peptide synthesizer using 250 μmol scale Fastmoc™ coupling cycles. Preloaded cartridges containing 1 mmol standard Fmoc-amino acids, except for the position of attachment of the fluorophore, where 1 mmol Fmoc-Lys(Mtt)-OH can be placed in the cartridge, and used with conductivity feedback monitoring. N-terminal acetylation can be accomplished by using 1 mmol acetic acid in a cartridge under standard coupling conditions.

Removal of 4-Methyltrityl (Mtt) From Lysine

The resin from the synthesizer can be washed thrice with DCM and kept wet. 150 mL of 95:4:1 dichloromethane:triisopropylsilane:trifluoroacetic acid can be flowed through the resin bed over 30 minutes. The mixture should turn deep yellow and then fad to pale yellow. 100 mL of DMF can be flowed through the bed over 15 minutes. The resin can then be washed thrice with DMF and filtered. Ninhydrin tests should show a strong signal for primary amine.

Resin Labeling With 6-Carboxyfluorescein-NHS (6-FAM-NHS)

The resin can be treated with 2 equivalents 6-FAM-NHS in 1% DIEA/DMF and stirred or shaken at ambient temperature overnight. When completed, the resin can be drained, washed thrice with DMF, thrice with (1% DCM and 1% methanol) and dried to provide an orange resin that was negative by ninhydrin test.

General Procedure For Cleavage And Deprotection Of Resin-Bound Peptide

Peptides can be cleaved from the resin by shaking for 3 hours at ambient temperature in a cleavage cocktail consisting of 80% TFA, 5% water, 5% thioanisole, 5% phenol, 2.5% TIS, and 2.5% EDT (1 mL/0.1 g resin). The resin can be removed by filtration and rinsing twice with TFA. The TFA can be evaporated from the filtrates, and

product precipitated with ether (10 mL/0.1 g resin), recovered by centrifugation, washed twice with ether (10 mL/0.1 g resin) and dried to give the crude peptide.

General Procedure For Purification Of Peptides

The crude peptides can be purified on a Gilson preparative HPLC system running Unipoint® analysis software (Gilson, Inc., Middleton, WI) on a radial compression column containing two 25 × 100 mm segments packed with Delta-Pak™ C18 15 μm particles with 100 Å pore size and eluted with one of the gradient methods listed below. One to two milliliters of crude peptide solution (10 mg/mL in 90% DMSO/water) can be purified per injection. The peaks containing the product(s) from each run can be pooled and lyophilized. All preparative runs can be run at 20 mL/min with eluents as buffer A: 0.1% TFA-water and buffer B: acetonitrile.

General Procedure For Analytical HPLC

Analytical HPLC can be performed on a Hewlett-Packard 1200 series system with a diode-array detector and a Hewlett-Packard 1046A fluorescence detector running HPLC 3D ChemStation software version A.03.04 (Hewlett-Packard. Palo Alto, CA) on a 4.6 × 250 mm YMC column packed with ODS-AQ 5 μm particles with a 120 Å pore size and eluted with one of the gradient methods listed below after preequilibrating at the starting conditions for 7 minutes. Eluents can be buffer A: 0.1% TFA-water and buffer B: acetonitrile. The flow rate for all gradients may be 1 mL/minute.

F-Bak: Peptide Probe: Acetyl--(SEQ ID NO: 1)GQVGRQLAIIGDK(6-FAM)-(SEQ ID NO: 2) INR-NH_2.

Fmoc-Rink amide MBHA resin can be extended using the general peptide synthesis procedure to provide the protected resin-bound peptide (1.020 g). The Mtt group can be removed, labeled with 6-FAM-NHS and cleaved and deprotected as described hereinabove to provide the crude product as an orange solid (0.37 g). This product can be purified by RP-HPLC. Fractions across the main peak can be tested by analytical RP-HPLC, and the pure fractions can be isolated and lyophilized, with the major peak providing the title compound (0.0802 g) as a yellow solid; MALDI-MS m/z = 2137.1 ($(M+H)^+$).

Alternative Synthesis of Peptide Probe F-Bak: Acetyl--(SEQ ID NO: 1) GQVGRQLAIIGDK(6-FAM)- -(SEQ ID NO: 2) INR-NH_2

The protected peptide can be assembled on 0.25 mmol Fmoc-Rink amide MBHA resin (Novabiochem) on an Applied Biosystems 433A automated peptide synthesizer running Fastmoc™ coupling cycles using pre-loaded 1 mmol amino acid cartridges, except for the fluorescein(6-FAM)-labeled lysine, where 1 mmol Fmoc-Lys(4-methyltrityl) can be weighed into the cartridge. The N-terminal acetyl group can be incorporated by putting 1 mmol acetic acid in a cartridge and coupled as described hereinabove. Selective removal of the 4-methyltrityl group can be accomplished with a solution of 95:4:1 DCM:TIS:TFA (v/v/v) flowing through the resin over 15 minutes, followed by quenching with a flow of dimethylformamide. Single-isomer 6-carboxyfluorescein-NHS can be reacted with the lysine side-chain in 1% DIEA in DMF and confirmed complete by ninhydrin testing. The peptide can be cleaved from the resin and side-chains deprotected by treating with 80:5:5:5:2.5:2.5 TFA:water: phenol: thioanisole:triisopropylsilane: 3,6-dioxa-1,8-octanedithiol (v/v/v/v/v/v), and the crude peptide recovered by precipitation with diethyl ether. The crude peptide can be purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography, and its purity and identity confirmed by analytical reverse-phase high-performance liquid chromatography and matrix-assisted laser-desorption mass-spectrometry (m/z = 2137.1 ($(M+H)^+$)).

Time Resolved-Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET) Assay

Representative compounds can be serially diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) starting at 50 μM (2× starting concentration; 10% DMSO) and 10 μL transferred into a 384-well plate. Then 10 μL of a protein/probe/antibody mix can be added to each well at final concentrations listed in the below Table AA

TABLE AA. Protein, Probe And Antibody For Use in TR-FRET Assays

Protein	Probe	Protein (nM)	Probe (nM)	Antibody	Antibody (nM)
GST-Bcl-2	F-Bak(SEQ. ID. No. 1) (GQVGRQLAIIGDK(6-FAM) (SEQ ID	1	100	Tb-anti-GST	1

	No.2)INR-amide)				
GST-Bcl-X_L	F-Bak(SEQ. ID. No. 1) (GQVGRQLAIIGDK(6-FAM) (SEQ ID No.2)INR-amide)	1	100	Tb-anti-GST	1

6-FAM = 6- carboxyfluorescein.; Tb = terbium; GST = glutathione S-transferase

The samples can then mixed on a shaker for 1 minute and incubated for an additional 3 hours at room temperature. For each assay, the probe/antibody and protein/probe/antibody can be included on each assay plate as negative and positive controls, respectively. Fluorescence can be measured on the Envision (Perkin Elmer) using a 340/35 nm excitation filter and 520/525 (F-Bak peptide) and 495/510 nm (Tb-labeled anti-Histidine antibody) emission filters.

dd) Treat, Treating or Treatment

The terms "treat", "treating" or "treatment" as used herein refer to administering one or more active agents or compounds to a subject in an effort to (i) prevent a pathologic condition from occurring (e.g. prophylaxis); (ii) inhibit the pathologic condition or arrest its development; (iii) relieve a pathologic condition and/or prevent or reduce the severity one or more symptoms associated with such a pathologic condition, regardless of whether any of items (i) through (iii) are successful in a subject.

ee) Variant Polynucleotide or Variant Nucleic Acid Sequence

A "variant polynucleotide" or a "variant nucleic acid sequence" means a polynucleotide having at least about 60% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% nucleic acid sequence identity and yet more preferably at least about 99% nucleic acid sequence identity with a given nucleic acid sequence. Variants do not encompass the native nucleotide sequence.

Ordinarily, variant polynucleotides are at least about 8 nucleotides in length, often at least about 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 nucleotides in length, or even about 75-200 nucleotides in length, or more.

The realm of nucleotides includes derivatives wherein the nucleic acid molecule has been covalently modified by substitution, chemical, enzymatic, or other appropriate means with a moiety other than a naturally occurring nucleotide.

B. Bcl-2 Family Protein Inhibitors

In one aspect, the present disclosure relates to certain Bcl-2 family protein inhibitor compounds.

Variable moieties of compounds herein are represented by identifiers (capital letters with numerical and/or alphabetical superscripts) and may be specifically embodied.

It is meant to be understood that proper valences are maintained for all moieties and combinations thereof and that monovalent moieties having more than one atom are attached through their left ends.

It is also meant to be understood that a specific aspect of a variable moiety may be the same or different as another specific aspect having the same identifier.

Compounds of this disclosure may contain asymmetrically substituted carbon atoms in the R or S configuration, wherein the terms "R" and "S" are as defined in Pure Appl. Chem. (1976) 45, 13-10. Compounds having asymmetrically substituted carbon atoms with equal amounts of R and S configurations are racemic at those atoms. Atoms having excess of one configuration over the other are assigned the configuration in excess, preferably an excess of about 85%-90%, more preferably an excess of about 95%-99%, and still more preferably an excess greater than about 99%. Accordingly, this disclosure is meant to embrace racemic mixtures and relative and absolute diastereoisomers of the compounds thereof.

Compounds of this disclosure may also contain carbon-carbon double bonds or carbon-nitrogen double bonds in the Z or E configuration, in which the term "Z" represents the larger two substituents on the same side of a carbon-carbon or carbon-nitrogen double bond and the term "E" represents the larger two substituents on opposite sides of a carbon-carbon or carbon-nitrogen double bond. The compounds of this disclosure may also exist as a mixture of "Z" and "E" isomers.

Compounds of this disclosure may also exist as tautomers or equilibrium mixtures thereof wherein a proton of a compound shifts from one atom to another. Examples of tautomers include, but are not limited to, keto-enol, phenol-keto, oxime-nitroso, nitro-aci, imine-enamine and the like.

Compounds having formula (II) having NH, C(O)OH, OH or SH moieties may have attached thereto prodrug-forming moieties. The prodrug-forming moieties are removed by metabolic processes and release the compounds having the freed NH, C(O)OH, OH or SH *in vivo*. Prodrugs are useful for adjusting such pharmacokinetic properties of the compounds as solubility and/or hydrophobicity, absorption in the gastrointestinal tract, bioavailability, tissue penetration, and rate of clearance.

Metabolites of compounds having formula (II), produced by in vitro or in vivo metabolic processes, may also have utility for treating diseases associated with expression of an anti-apoptotic family protein member such as of Bcl-X_L protein, Bcl-2 protein or Bcl-w protein.

Certain precursor compounds which may be metabolized in vitro or in vivo to form compounds having formula (II) may also have utility for treating diseases associated with expression of an anti-apoptotic family protein member such as of Bcl-X_L protein, Bcl-2 protein or Bcl-w protein.

Compounds having formula (II) may exist as acid addition salts, basic addition salts or zwitterions. Salts of compounds having formula (II) are prepared during their isolation or following their purification. Acid addition salts are those derived from the reaction of a compound having formula (II) with acid. Accordingly, salts including the acetate, adipate, alginate, bicarbonate, citrate, aspartate, benzoate, benzenesulfonate (besylate), bisulfate, butyrate, camphorate, camphorsufonate, digluconate, formate, fumarate, glycerophosphate, glutamate, hemisulfate, heptanoate, hexanoate, hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, lactobionate, lactate, maleate, mesitylenesulfonate, methanesulfonate, naphthylenesulfonate, nicotinate, oxalate, pamoate, pectinate, persulfate, phosphate, picrate, propionate, succinate, tartrate, thiocyanate, trichloroacetic, trifluoroacetic, para-toluenesulfonate and undecanoate salts of the compounds having formula (II) are meant to be embraced by this disclosure. Basic addition salts of compounds are those derived from the reaction of the compounds

having formula (II) with the bicarbonate, carbonate, hydroxide or phosphate of cations such as lithium, sodium, potassium, calcium and magnesium.

Compounds having formula (II) may be administered, for example, bucally, ophthalmically, orally, osmotically, parenterally (intramuscularly, intraperintoneally intrasternally, intravenously, subcutaneously), rectally, topically, transdermally, vaginally and intraarterially as well as by intraarticular injection, infusion, and placement in the body, such as, for example, the vasculature by means of, for example, a stent.

Therapeutically effective amounts of a compound having formula (II) depend on recipient of treatment, disease treated and severity thereof, composition comprising it, time of administration, route of administration, duration of treatment, potency, rate of clearance and whether or not another drug is co-administered. The amount of a compound having formula (II) used to make a composition to be administered daily to a patient in a single dose or in divided doses is from about 0.03 to about 200 mg/kg body weight. Single dose compositions contain these amounts or a combination of submultiples thereof.

Compounds having formula (II) may be administered with or without an excipient. Excipients include, but are not limited to, encapsulators and additives such as absorption accelerators, antioxidants, binders, buffers, coating agents, coloring agents, diluents, disintegrating agents, emulsifiers, extenders, fillers, flavoring agents, humectants, lubricants, perfumes, preservatives, propellants, releasing agents, sterilizing agents, sweeteners, solubilizers, wetting agents, mixtures thereof and the like.

Excipients for preparation of compositions comprising a compound having formula (II) to be administered orally include, but are not limited to, agar, alginic acid, aluminum hydroxide, benzyl alcohol, benzyl benzoate, 1,3-butylene glycol, carbomers, castor oil, cellulose, cellulose acetate, cocoa butter, corn starch, corn oil, cottonseed oil, cross-povidone, diglycerides, ethanol, ethyl cellulose, ethyl laureate, ethyl oleate, fatty acid esters, gelatin, germ oil, glucose, glycerol, groundnut oil, hydroxypropylmethyl celluose, isopropanol, isotonic saline, lactose, magnesium hydroxide, magnesium stearate, malt, mannitol, monoglycerides, olive oil, peanut oil, potassium phosphate salts, potato starch, povidone, propylene glycol, Ringer's solution, safflower oil, sesame oil,

sodium carboxymethyl cellulose, sodium phosphate salts, sodium lauryl sulfate, sodium sorbitol, soybean oil, stearic acids, stearyl fumarate, sucrose, surfactants, talc, tragacanth, tetrahydrofurfuryl alcohol, triglycerides, water, mixtures thereof and the like. Excipients for preparation of compositions comprising a compound having formula (II) to be administered ophthalmically or orally include, but are not limited to, 1,3-butylene glycol, castor oil, corn oil, cottonseed oil, ethanol, fatty acid esters of sorbitan, germ oil, groundnut oil, glycerol, isopropanol, olive oil, polyethylene glycols, propylene glycol, sesame oil, water, mixtures thereof and the like. Excipients for preparation of compositions comprising a compound having formula (II) to be administered osmotically include, but are not limited to, chlorofluorohydrocarbons, ethanol, water, mixtures thereof and the like. Excipients for preparation of compositions comprising a compound having formula (II) to be administered parenterally include, but are not limited to, 1,3-butanediol, castor oil, corn oil, cottonseed oil, dextrose, germ oil, groundnut oil, liposomes, oleic acid, olive oil, peanut oil, Ringer's solution, safflower oil, sesame oil, soybean oil, U.S.P. or isotonic sodium chloride solution, water, mixtures thereof and the like. Excipients for preparation of compositions comprising a compound having formula (II) to be administered rectally or vaginally include, but are not limited to, cocoa butter, polyethylene glycol, wax, mixtures thereof and the like.

This disclosure also comprises combination therapeutic methods of treating disease conditions involving abnormal cell growth and/or dysregulated apoptosis, such as cancer, in a patient comprising administering thereto a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising a compound having formula (II) and a therapeutically effective amount of one or more than one additional therapeutic agents and / or ionizing radiation.

The combination therapeutic methods include administering compositions of a compound having formula (II) and one or more than one additional therapeutic agents or ionizing radiation to a patient using any desired dosing and/or scheduling regimen.

Compounds having formula (II) are expected to be useful when used with alkylating agents, angiogenesis inhibitors, antibodies, antimetabolites, antimitotics, antiproliferatives, antivirals, aurora kinase inhibitors, other apoptosis promoters (for example, Bcl-xL, Bcl-w and Bfl-1) inhibitors, activators of death receptor pathway, Bcr-

Abl kinase inhibitors, BiTE (Bi-Specific T cell Engager) antibodies, antibody drug conjugates, biologic response modifiers, cyclin-dependent kinase inhibitors, cell cycle inhibitors, cyclooxygenase-2 inhibitors, DVDs, leukemia viral oncogene homolog (ErbB2) receptor inhibitors, growth factor inhibitors, heat shock protein (HSP)-90 inhibitors, histone deacetylase (HDAC) inhibitors, hormonal therapies, immunologicals, inhibitors of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs), intercalating antibiotics, kinase inhibitors, kinesin inhibitors, Jak2 inhibitors, mammalian target of rapamycin inhibitors, microRNA's, mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase inhibitors, multivalent binding proteins, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), poly ADP (adenosine diphosphate)-ribose polymerase (PARP) inhibitors, platinum chemotherapeutics, polo-like kinase (Plk) inhibitors, phosphoinositide-3 kinase (PI3K) inhibitors, proteosome inhibitors, purine analogs, pyrimidine analogs, receptor tyrosine kinase inhibitors, etinoids/deltoids plant alkaloids, small inhibitory ribonucleic acids (siRNAs), topoisomerase inhibitors, ubiquitin ligase inhibitors, and the like, and in combination with one or more of these agents.

BiTE antibodies are bi-specific antibodies that direct T-cells to attack cancer cells by simultaneously binding the two cells. The T-cell then attacks the target cancer cell. Examples of BiTE antibodies include adecatumumab (Micromet MT201), blinatumomab (Micromet MT103) and the like. Without being limited by theory, one of the mechanisms by which T-cells elicit apoptosis of the target cancer cell is by exocytosis of cytolytic granule components, which include perforin and granzyme B. In this regard, Bcl-2 has been shown to attenuate the induction of apoptosis by both perforin and granzyme B. These data suggest that inhibition of Bcl-2 could enhance the cytotoxic effects elicited by T-cells when targeted to cancer cells (V.R. Sutton, D.L. Vaux and J.A. Trapani (1997) *J. of Immunology.* 158 (12): 5783).

SiRNAs are molecules having endogenous RNA bases or chemically modified nucleotides. The modifications do not abolish cellular activity, but rather impart increased stability and/or increased cellular potency. Examples of chemical modifications include phosphorothioate groups, 2'-deoxynucleotide, 2'-OCH3-containing ribonucleotides, 2'-F-ribonucleotides, 2'-methoxyethyl ribonucleotides, combinations thereof and the like. The siRNA can have varying lengths (e.g., 10-200 bps) and

structures (e.g., hairpins, single/double strands, bulges, nicks/gaps, mismatches) and are processed in cells to provide active gene silencing. A double-stranded siRNA (dsRNA) can have the same number of nucleotides on each strand (blunt ends) or asymmetric ends (overhangs). The overhang of 1-2 nucleotides can be present on the sense and/or the antisense strand, as well as present on the 5'- and/ or the 3'-ends of a given strand. For example, siRNAs targeting Mcl-1 have been shown to enhance the activity of ABT-263, (i.e., N-(4-(4-((2-(4-chlorophenyl)-5,5-dimethyl-1-cyclohex-1-en-1-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(morpholin-4-yl)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-((trifluoromethyl)sulfonyl)benzenesulfonamide) or ABT-737 (i.e., N-(4-(4-((4'-chloro(1,1'-biphenyl)-2-yl)methyl)piperazin-1-yl)benzoyl)-4-(((1R)-3-(dimethylamino)-1-((phenylsulfanyl)methyl)propyl)amino)-3-nitrobenzenesulfonamide) in multiple tumor cell lines (Tse et. al (2008) *Cancer Research.* 68(9): 3421 and references therein).

Multivalent binding proteins are binding proteins comprising two or more antigen binding sites. Multivalent binding proteins are engineered to have the three or more antigen binding sites and are generally not naturally occurring antibodies. The term "multispecific binding protein" means a binding protein capable of binding two or more related or unrelated targets. Dual variable domain (DVD) binding proteins are tetravalent or multivalent binding proteins binding proteins comprising two or more antigen binding sites. Such DVDs may be monospecific (i.e., capable of binding one antigen) or multispecific (i.e., capable of binding two or more antigens). DVD binding proteins comprising two heavy chain DVD polypeptides and two light chain DVD polypeptides are referred to as DVD Ig's. Each half of a DVD Ig comprises a heavy chain DVD polypeptide, a light chain DVD polypeptide, and two antigen binding sites. Each binding site comprises a heavy chain variable domain and a light chain variable domain with a total of 6 CDRs involved in antigen binding per antigen binding site.

Alkylating agents include altretamine, AMD-473, AP-5280, apaziquone, bendamustine, brostallicin, busulfan, carboquone, carmustine (BCNU), chlorambucil, CLORETAZINE® (laromustine, VNP 40101M), cyclophosphamide, decarbazine, estramustine, fotemustine, glufosfamide, ifosfamide, KW-2170, lomustine (CCNU), mafosfamide, melphalan, mitobronitol, mitolactol, nimustine, nitrogen mustard N-oxide,

ranimustine, temozolomide, thiotepa, TREANDA® (bendamustine), treosulfan, rofosfamide and the like.

Angiogenesis inhibitors include endothelial-specific receptor tyrosine kinase (Tie-2) inhibitors, epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors, insulin growth factor-2 receptor (IGFR-2) inhibitors, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) inhibitors, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) inhibitors, platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) inhibitors, thrombospondin analogs, vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase (VEGFR) inhibitors and the like.

Antimetabolites include ALIMTA® (pemetrexed disodium, LY231514, MTA), 5-azacitidine, XELODA® (capecitabine), carmofur, LEUSTAT® (cladribine), clofarabine, cytarabine, cytarabine ocfosfate, cytosine arabinoside, decitabine, deferoxamine, doxifluridine, eflornithine, EICAR (5-ethynyl-1- -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide), enocitabine, ethnylcytidine, fludarabine, 5-fluorouracil alone or in combination with leucovorin, GEMZAR® (gemcitabine), hydroxyurea, ALKERAN®(melphalan), mercaptopurine, 6-mercaptopurine riboside, methotrexate, mycophenolic acid, nelarabine, nolatrexed, ocfosfate, pelitrexol, pentostatin, raltitrexed, Ribavirin, triapine, trimetrexate, S-1, tiazofurin, tegafur, TS-1, vidarabine, UFT and the like.

Antivirals include ritonavir, hydroxychloroquine and the like.

Bcr-Abl kinase inhibitors include DASATINIB® (BMS-354825), GLEEVEC® (imatinib) and the like.

CDK inhibitors include AZD-5438, BMI-1040, BMS-032, BMS-387, CVT-2584, flavopyridol, GPC-286199, MCS-5A, PD0332991, PHA-690509, seliciclib (CYC-202, R-roscovitine), ZK-304709 and the like.

COX-2 inhibitors include ABT-963, ARCOXIA® (etoricoxib), BEXTRA® (valdecoxib), BMS347070, CELEBREX® (celecoxib), COX-189 (lumiracoxib), CT-3, DERAMAXX® (deracoxib), JTE-522, 4-methyl-2-(3,4-dimethylphenyl)-1-(4-sulfamoylphenyl-1H-pyrrole), MK-663 (etoricoxib), NS-398, parecoxib, RS-57067, SC-58125, SD-8381, SVT-2016, S-2474, T-614, VIOXX® (rofecoxib) and the like.

EGFR inhibitors include ABX-EGF, anti-EGFR immunoliposomes, EGF-vaccine, EMD-7200, ERBITUX® (cetuximab), HR3, IgA antibodies, IRESSA® (gefitinib),

TARCEVA® (erlotinib or OSI-774), TP-38, EGFR fusion protein, TYKERB® (lapatinib) and the like.

ErbB2 receptor inhibitors include CP-724-714, CI-1033 (canertinib), HERCEPTIN® (trastuzumab), TYKERB® (lapatinib), OMNITARG® (2C4, petuzumab), TAK-165, GW-572016 (ionafarnib), GW-282974, EKB-569, PI-166, dHER2 (HER2 vaccine), APC-8024 (HER-2 vaccine), anti-HER/2neu bispecific antibody, B7.her2IgG3, AS HER2 trifunctional bispecific antibodies, mAB AR-209, mAB 2B-1 and the like.

Histone deacetylase inhibitors include depsipeptide, LAQ-824, MS-275, trapoxin, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), TSA, valproic acid and the like.

HSP-90 inhibitors include 17-AAG-nab, 17-AAG, CNF-101, CNF-1010, CNF-2024, 17-DMAG, geldanamycin, IPI-504, KOS-953, MYCOGRAB® (human recombinant antibody to HSP-90), NCS-683664, PU24FCl, PU-3, radicicol, SNX-2112, STA-9090 VER49009 and the like.

Inhibitors of inhibitors of apoptosis proteins include HGS1029, GDC-0145, GDC-0152, LCL-161, LBW-242 and the like.

Antibody drug conjugates include anti-CD22-MC-MMAF, anti-CD22-MC-MMAE, anti-CD22-MCC-DM1, CR-011-vcMMAE, PSMA-ADC, MEDI-547, SGN-19Am SGN-35, SGN-75 and the like.

Activators of death receptor pathway include TRAIL, antibodies or other agents that target TRAIL or death receptors (e.g., DR4 and DR5) such as Apomab, conatumumab, ETR2-ST01, GDC0145, (lexatumumab), HGS-1029, LBY-135, PRO-1762 and trastuzumab.

Kinesin inhibitors include Eg5 inhibitors such as AZD4877, ARRY-520; CENPE inhibitors such as GSK923295A and the like.

JAK-2 inhibitors include CEP-701 (lesaurtinib), XL019 and INCB018424 and the like.

MEK inhibitors include ARRY-142886, ARRY-438162 PD-325901, PD-98059 and the like.

mTOR inhibitors include AP-23573, CCI-779, everolimus, RAD-001, rapamycin, temsirolimus, ATP-competitive TORC1/TORC2 inhibitors, including PI-103, PP242, PP30, Torin 1 and the like.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs include AMIGESIC® (salsalate), DOLOBID® (diflunisal), MOTRIN® (ibuprofen), ORUDIS® (ketoprofen), RELAFEN® (nabumetone), FELDENE® (piroxicam), ibuprofen cream, ALEVE® (naproxen) and NAPROSYN® (naproxen), VOLTAREN® (diclofenac), INDOCIN® (indomethacin), CLINORIL® (sulindac), TOLECTIN® (tolmetin), LODINE® (etodolac), TORADOL® (ketorolac), DAYPRO® (oxaprozin) and the like.

PDGFR inhibitors include C-451, CP-673, CP-868596 and the like.

Platinum chemotherapeutics include cisplatin, ELOXATIN® (oxaliplatin) eptaplatin, lobaplatin, nedaplatin, PARAPLATIN® (carboplatin), satraplatin, picoplatin and the like.

Polo-like kinase inhibitors include BI-2536 and the like.

Phosphoinositide-3 kinase (PI3K) inhibitors include wortmannin, LY294002, XL-147, CAL-120, ONC-21, AEZS-127, ETP-45658, PX-866, GDC-0941, BGT226, BEZ235, XL765 and the like.

Thrombospondin analogs include ABT-510, ABT-567, ABT-898, TSP-1 and the like.

VEGFR inhibitors include AVASTIN® (bevacizumab), ABT-869, AEE-788, ANGIOZYME™ (a ribozyme that inhibits angiogenesis (Ribozyme Pharmaceuticals (Boulder, CO.) and Chiron, (Emeryville, CA)) , axitinib (AG-13736), AZD-2171, CP-547,632, IM-862, MACUGEN (pegaptamib), NEXAVAR® (sorafenib, BAY43-9006), pazopanib (GW-786034), vatalanib (PTK-787, ZK-222584), SUTENT® (sunitinib, SU-11248), VEGF trap, ZACTIMA™ (vandetanib, ZD-6474) and the like.

Antibiotics include intercalating antibiotics aclarubicin, actinomycin D, amrubicin, annamycin, adriamycin, BLENOXANE® (bleomycin), daunorubicin, CAELYX® or MYOCET® (liposomal doxorubicin), elsamitrucin, epirbucin, glarbuicin, ZAVEDOS® (idarubicin), mitomycin C, nemorubicin, neocarzinostatin, peplomycin, pirarubicin, rebeccamycin, stimalamer, streptozocin, VALSTAR® (valrubicin), zinostatin and the like.

Topoisomerase inhibitors include aclarubicin, 9-aminocamptothecin, amonafide, amsacrine, becatecarin, belotecan, BN-80915, CAMPTOSAR® (irinotecan hydrochloride), camptothecin, CARDIOXANE® (dexrazoxine), diflomotecan, edotecarin, ELLENCE® or PHARMORUBICIN® (epirubicin), etoposide, exatecan, 10-hydroxycamptothecin, gimatecan, lurtotecan, mitoxantrone, orathecin, pirarbucin, pixantrone, rubitecan, sobuzoxane, SN-38, tafluposide, topotecan and the like.

Antibodies include AVASTIN® (bevacizumab), CD40-specific antibodies, chTNT-1/B, denosumab, ERBITUX® (cetuximab), HUMAX-CD4® (zanolimumab), IGF1R-specific antibodies, lintuzumab, PANOREX® (edrecolomab), RENCAREX® (WX G250), RITUXAN® (rituximab), ticilimumab, trastuzimab, CD20 antibodies types I and II and the like.

Hormonal therapies include ARIMIDEX® (anastrozole), AROMASIN® (exemestane), arzoxifene, CASODEX® (bicalutamide), CETROTIDE® (cetrorelix), degarelix, deslorelin, DESOPAN® (trilostane), dexamethasone, DROGENIL® (flutamide), EVISTA® (raloxifene), AFEMA™ (fadrozole), FARESTON® (toremifene), FASLODEX® (fulvestrant), FEMARA® (letrozole), formestane, glucocorticoids, HECTOROL® (doxercalciferol), RENAGEL® (sevelamer carbonate), lasofoxifene, leuprolide acetate, MEGACE® (megesterol), MIFEPREX® (mifepristone), NILANDRON™ (nilutamide), NOLVADEX® (tamoxifen citrate), PLENAXIS™ (abarelix), prednisone, PROPECIA® (finasteride), rilostane, SUPREFACT® (buserelin), TRELSTAR® (luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)), VANTAS® (Histrelin implant), VETORYL® (trilostane or modrastane), ZOLADEX® (fosrelin, goserelin) and the like.

Deltoids and retinoids include seocalcitol (EB1089, CB1093), lexacalcitrol (KH1060), fenretinide, PANRETIN® (aliretinoin), ATRAGEN® (liposomal tretinoin), TARGRETIN® (bexarotene), LGD-1550 and the like.

PARP inhibitors include ABT-888, olaparib, KU-59436, AZD-2281, AG-014699, BSI-201, BGP-15, INO-1001, ONO-2231 and the like.

Plant alkaloids include, but are not limited to, vincristine, vinblastine, vindesine, vinorelbine and the like.

Proteasome inhibitors include VELCADE® (bortezomib), MG132, NPI-0052, PR-171 and the like.

Examples of immunologicals include interferons and other immune-enhancing agents. Interferons include interferon alpha, interferon alpha-2a, interferon alpha-2b, interferon beta, interferon gamma-1a, ACTIMMUNE® (interferon gamma-1b) or interferon gamma-n1, combinations thereof and the like. Other agents include ALFAFERONE®, (IFN-), BAM-002 (oxidized glutathione), BEROMUN® (tasonermin), BEXXAR® (tositumomab), CAMPATH® (alemtuzumab), CTLA4 (cytotoxic lymphocyte antigen 4), decarbazine, denileukin, epratuzumab, GRANOCYTE® (lenograstim), lentinan, leukocyte alpha interferon, imiquimod, MDX-010 (anti-CTLA-4), melanoma vaccine, mitumomab, molgramostim, MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin), NEUPOGEN® (filgrastim), OncoVAC-CL, OVAREX® (oregovomab), pemtumomab (Y-muHMFG1), PROVENGE® (sipuleucel-T), sargaramostim, sizofilan, teceleukin, THERACYS® (Bacillus Calmette-Guerin), ubenimex, VIRULIZIN® (immunotherapeutic, Lorus Pharmaceuticals), Z-100 (Specific Substance of Maruyama (SSM)), WF-10 (Tetrachlorodecaoxide (TCDO)), PROLEUKIN® (aldesleukin), ZADAXIN® (thymalfasin), ZENAPAX® (daclizumab), ZEVALIN® (90Y-Ibritumomab tiuxetan) and the like.

Biological response modifiers are agents that modify defense mechanisms of living organisms or biological responses, such as survival, growth or differentiation of tissue cells to direct them to have anti-tumor activity and include krestin, lentinan, sizofiran, picibanil PF-3512676 (CpG-8954), ubenimex and the like.

Pyrimidine analogs include cytarabine (ara C or Arabinoside C), cytosine arabinoside, doxifluridine, FLUDARA® (fludarabine), 5-FU (5-fluorouracil), floxuridine, GEMZAR® (gemcitabine), TOMUDEX® (ratitrexed), TROXATYL™ (triacetyluridine troxacitabine) and the like.

Purine analogs include LANVIS® (thioguanine) and PURI-NETHOL® (mercaptopurine).

Antimitotic agents include batabulin, epothilone D (KOS-862), N-(2-((4-hydroxyphenyl)amino)pyridin-3-yl)-4-methoxybenzenesulfonamide, ixabepilone (BMS

247550), paclitaxel, TAXOTERE® (docetaxel), PNU100940 (109881), patupilone, XRP-9881 (larotaxel), vinflunine, ZK-EPO (synthetic epothilone) and the like.

Ubiquitin ligase inhibitors include MDM2 inhibitors, such as nutlins, NEDD8 inhibitors such as MLN4924 and the like.

Compounds of this disclosure can also be used as radiosensitizers that enhance the efficacy of radiotherapy. Examples of radiotherapy include external beam radiotherapy, teletherapy, brachytherapy and sealed, unsealed source radiotherapy and the like.

Additionally, compounds having Formula (II) may be combined with other chemotherapeutic agents such as ABRAXANE™ (ABI-007), ABT-100 (farnesyl transferase inhibitor), ADVEXIN® (Ad5CMV-p53 vaccine), ALTOCOR® or MEVACOR® (lovastatin), AMPLIGEN® (poly I:poly C12U, a synthetic RNA), APTOSYN® (exisulind), AREDIA® (pamidronic acid), arglabin, L-asparaginase, atamestane (1-methyl-3,17-dione-androsta-1,4-diene), AVAGE® (tazarotene), AVE-8062 (combreastatin derivative) BEC2 (mitumomab), cachectin or cachexin (tumor necrosis factor), canvaxin (vaccine), CEAVAC® (cancer vaccine), CELEUK® (celmoleukin), CEPLENE® (histamine dihydrochloride), CERVARIX® (human papillomavirus vaccine), CHOP® (C: CYTOXAN® (cyclophosphamide); H: ADRIAMYCIN® (hydroxydoxorubicin); O: Vincristine (ONCOVIN®); P: prednisone), CYPAT™ (cyproterone acetate), combrestatin A4P, DAB(389)EGF (catalytic and translocation domains of diphtheria toxin fused via a His-Ala linker to human epidermal growth factor) or TransMID-107R™ (diphtheria toxins), dacarbazine, dactinomycin, 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA), eniluracil, EVIZON™ (squalamine lactate), DIMERICINE® (T4N5 liposome lotion), discodermolide, DX-8951f (exatecan mesylate), enzastaurin, EPO906 (epithilone B), GARDASIL® (quadrivalent human papillomavirus (Types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine), GASTRIMMUNE®, GENASENSE®, GMK (ganglioside conjugate vaccine), GVAX® (prostate cancer vaccine), halofuginone, histerelin, hydroxycarbamide, ibandronic acid, IGN-101, IL-13-PE38, IL-13-PE38QQR (cintredekin besudotox), IL-13-pseudomonas exotoxin, interferon-α, interferon-γ, JUNOVAN™ or MEPACT™ (mifamurtide), lonafarnib, 5,10-methylenetetrahydrofolate, miltefosine (hexadecylphosphocholine),

NEOVASTAT®(AE-941), NEUTREXIN® (trimetrexate glucuronate), NIPENT® (pentostatin), ONCONASE® (a ribonuclease enzyme), ONCOPHAGE® (melanoma vaccine treatment), ONCOVAX® (IL-2 Vaccine), ORATHECIN™ (rubitecan), OSIDEM® (antibody-based cell drug), OVAREX® MAb (murine monoclonal antibody), paclitaxel, PANDIMEX™ (aglycone saponins from ginseng comprising 20(S)protopanaxadiol (aPPD) and 20(S)protopanaxatriol (aPPT)), panitumumab, PANVAC®-VF (investigational cancer vaccine), pegaspargase, PEG Interferon A, phenoxodiol, procarbazine, rebimastat, REMOVAB® (catumaxomab), REVLIMID® (lenalidomide), RSR13 (efaproxiral), SOMATULINE® LA (lanreotide), SORIATANE® (acitretin), staurosporine (Streptomyces staurospores), talabostat (PT100), TARGRETIN® (bexarotene), TAXOPREXIN® (DHA-paclitaxel), TELCYTA® (canfosfamide, TLK286), temilifene, TEMODAR® (temozolomide), tesmilifene, thalidomide, THERATOPE® (STn-KLH), thymitaq (2-amino-3,4-dihydro-6-methyl-4-oxo-5-(4-pyridylthio)quinazoline dihydrochloride), TNFERADE™ (adenovector: DNA carrier containing the gene for tumor necrosis factor-α), TRACLEER® or ZAVESCA® (bosentan), tretinoin (Retin-A), tetrandrine, TRISENOX® (arsenic trioxide), VIRULIZIN®, ukrain (derivative of alkaloids from the greater celandine plant), vitaxin (anti-alphavbeta3 antibody), XCYTRIN® (motexafin gadolinium), XINLAY™ (atrasentan), XYOTAX™ (paclitaxel poliglumex), YONDELIS® (trabectedin), ZD-6126, ZINECARD® (dexrazoxane), ZOMETA® (zolendronic acid), zorubicin and the like.

BAX and BAD peptides are reported in Zhang, H. C., Nimmer, P., Rosenberg, S. H., Ng, S. C., and Joseph, M. (2002). Development of a High-Throughput Fluorescence Polarization Assay for Bcl-x(L). *Analytical Biochemistry* 307, 70-75.

Binding affinity of compounds having formula (II) to Bcl-X_L protein is indicia of their inhibition of the activity of this protein. To determine the binding affinity of compounds having formula (II) to Bcl-X_L protein, representative examples were diluted in DMSO to concentrations between 100 μM and 1 pM and added to each well of a 96-well microtiter plate. A mixture comprising 125 μL per well of assay buffer (20 mM phosphate buffer (pH 7.4), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.05% PF-68), 6 nM of Bcl-X_L protein

(prepared as described in *Science* 1997, 275, 983-986), 1 nM fluorescein-labeled BAD peptide (prepared in-house) and the DMSO solution of the compound was shaken for 2 minutes and placed in a LJL Analyst (LJL Bio Systems, CA). A negative control (DMSO, 15 nM BAD peptide, assay buffer) and a positive control (DMSO, 1 nM BAD peptide, 6 nM Bcl-X_L, assay buffer) were used to determine the range of the assay. Polarization was measured at room temperature using a continuous Fluorescein lamp (excitation 485 nm, emission 530 nm). Percentage of inhibition was determined by (1-((mP value of well-negative control)/range)) × 100%. The results are shown in TABLE 1.

Binding affinity of compounds having formula (II) to Bcl-2 protein is indicia of their inhibition of the activity of this protein. To determine the binding affinity of compounds having formula (II) to Bcl-2, representative examples were diluted in DMSO to concentrations between 10 μM and 10 pM and added to each well of a 96-well microtiter plate. A mixture comprising 125 L per well of assay buffer (20 mM phosphate buffer (pH 7.4), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.05% PF-68), 10 nM of Bcl-2 protein (prepared according to the procedure described in *PNAS* 2001, 98, 3012 - 3017), 1 nM fluorescein-labeled BAX peptide (prepared in-house) and the DMSO solution of the representative EXAMPLE was shaken for 2 minutes and placed in a LJL Analyst (LJL Bio Systems, CA. Polarization was measured at room temperature using a continuous Fluorescein lamp (excitation 485 nm, emission 530 nm). The results are also shown in TABLE 1.

These data demonstrate the utility of compounds having formula (II) as binders to and inhibitors of anti-apopotic Bcl-X_L protein and anti-apopotic Bcl-2.

It is expected that, because compounds having formula (II) bind to and inhibit the activity of Bcl-X_L and Bcl-2, they would also have utility as inhibitors of anti-apopotic family protein members having close structural homology to Bcl-X_L and Bcl-2 such as, for example, anti-apopotic Bcl-w protein.

Accordingly, compounds having formula (II) are expected to have utility in treatment of diseases during which anti-apopotic Bcl-X_L protein, anti-apopotic Bcl-2 protein, anti-apopotic Bcl-w protein or a combination thereof, are expressed.

Determination of Cellular Efficacy in Human Tumor Cell Line

NCI-H146 (ATCC, Manassas, VA.) human small cell lung carcinoma cells were plated 50,000 cells per well in 96-well tissue culture plates in a total volume of 100 μL tissue culture medium supplemented with 10% human serum (Invitrogen, Carlsbad, CA.) instead of fetal bovine serum and treated with a 2-fold serial dilution of the compounds of interest from 10 μM to 0.020 μM. Each concentration was tested in duplicate at least 3 separate times. The number of viable cells following 48 hours of compound treatment was determined using the CellTiter 96® AQ_{ueous} non-radioactive cell proliferation MTS assay according to manufacturer's recommendations (Promega Corp., Madison, WI). The results are also shown in TABLE 1.

Pharmacokinetic Evaluation of Selected Compounds in Rat

The pharmacokinetic behavior of compounds of this disclosure was determined following a single 2 mg/kg intravenous or 5 mg/kg oral dose in male Sprague-Dawley derived rats (n=3 per group). The compounds were prepared as 2 mg/mL solution in a 10% DMSO in PEG-400 formulation for both oral and intravenous administration. The 1 mL/kg intravenous dose was administered as a slow bolus (about 1-2 minutes) in the jugular vein of a rat under light ether anesthetic. The oral dose was administered by gavage. Serial blood samples were obtained from a tail vein of each rat prior 0.1 (IV only), 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 and 24 hours after dosing. The heparinized samples were thoroughly mixed and placed in an ice bath. Plasma was separated by centrifugation and stored frozen prior to analysis. The results are also shown in TABLE 1.

The compounds of interest were separated from the plasma using protein precipitation with acetonitrile. A plasma (100-200 μL, sample or spiked standard) aliquot was combined with 50 μL of internal standard (structurally related analog prepared in acetonitrile) and 1 ml acetonitrile in a 96-well polypropylene deep well plate. The plates were vortexed for 30 seconds followed by centrifugation (3500 rpm x 15 minutes, 4°C). In an automated manner, the supernatant was transferred to a clean 96-well plate. The samples were evaporated to near dryness on a Micro-Vap™ under a stream of dry nitrogen over low heat (~37°C). The samples were reconstituted vortexing with 0.2 mL 5% DMSO in acetonitrile. A 0.1-0.2 ml aliquot of acetonitrile: 0.1% trifluoroacetic acid (20:80, by volume) was added to each well, followed by an additional

30 second vortexing. The plates were centrifuged (3500 rpm × 15 minutes, 4°C) prior to HPLC-MS/MS analysis. Samples were analyzed simultaneously with spiked plasma standards. All samples from each study were analyzed as a single batch on the LC-MS/MS.

The compounds of interest and the internal standard were separated from each other and co-extracted contaminants on a 50 x 3 mm Keystone Betasil CN 5 μm column with an acetonitrile: 0.1% trifluoroacetic acid mobile phase (50:50, by volume) at a flow rate of 0.7 ml/min. Analysis was performed on a Sciex API 300™ Biomolecular Mass Analyzer using a heated nebulizer interface. Peak areas of the title compounds and internal standards were determined using the Sciex MacQuan™ software. Calibration curves were derived from peak area ratio (parent drug/internal standard) of the spiked rat plasma standards using least squares linear regression of the ratio versus the theoretical concentration. The methods were generally linear over the range of the standard curve (correlation coefficients > 0.99) with an estimated quantitation limit of 0.01 μg/mL. The plasma concentration data for each animal were submitted to multi-exponential curve fitting using WinNonlin. The area under the plasma concentration-time curve from 0 to t hours (time of the last measurable plasma concentration) after dosing (AUC_{0-t}) was calculated using the linear trapezoidal rule for the plasma concentration-time profiles. The residual area extrapolated to infinity, determined as the final measured plasma concentration (C_t) divided by the terminal elimination rate constant (β), was added to AUC_{0-t} to produce the total area under the curve ($AUC_{0-\infty}$). The results are also shown in TABLE 1. Ki values shown in the tables below were determined using Wang's equation (Wang Z X,. An Exact Mathematical Expression For Describing Competitive Binding Of Two Different Ligands To A Protein Molecule. *FEBS Lett.* 1995; 360:111-4)).

TABLE 1

	Target Binding Affinity		NCI-H146 Cellular Efficacy	Pharmacokinetic area under the plasma concentration Curve (rat)	PK/PD ratio
Ex.	Ki (Bcl-2)	Ki (Bcl-X_L)	EC_{50}	$AUC_{0-\infty}$	AUC/EC_{50}

1	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0891 μM	5.01 μM	56
2	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0291 μM	7.01 μM	241
3	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0288 μM	4.13 μM	144
4	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0587 μM	6.34 μM	108
5	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0388 μM	2.22 μM	57
6	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0010 μM	0.91 μM	91
7	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0589 μM	3.87 μM	66
8	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0212 μM	1.10 μM	52
9	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0137 μM	1.88 μM	137
10	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0342 μM	2.48 μM	73
11	≤ 0.002 μM	≤ 0.003 μM	0.0206 μM	2.40 μM	117
12	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0271 μM	2.07 μM	76
13	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0190 μM	2.06 μM	108
14	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0309 μM	3.42 μM	111
15	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0099 μM	1.25 μM	126
16	≤ 0.002 μM	≤ 0.002 μM	0.0374 μM	2.37 μM	63
17	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0287 μM	0.88 μM	31
18	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0154 μM	0.61 μM	40
19	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0158 μM	7.12 μM	451
20	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0277 μM	3.11 μM	112
21	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0643 μM	1.81 μM	28
22	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0388 μM	4.08 μM	105
23	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0528 μM	3.54 μM	67
24	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0443 μM	8.04 μM	181
25	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0164 μM	1.67 μM	102
26	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0243 μM	0.80 μM	33
27	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0185 μM	2.08 μM	112
28	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0242 μM	6.30 μM	260
29	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0298 μM	1.74 μM	58
30	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0317 μM	3.39 μM	107
31	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0130 μM	5.10 μM	392
32	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0187 μM	1.38 μM	73.9
33	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0378 μM	3.01 μM	79.8
34	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0200 μM	11.07 μM	554

35	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0076 μM	1.26 μM	166
36	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0242 μM	4.22 μM	174
37	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0175 μM	7.30 μM	417
38	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0394 μM	0.67 μM	17
39	≤ 0.001 μM	≤ 0.001 μM	0.0827 μM	1.66 μM	20

The compounds of the present disclosure were compared to compounds disclosed in WO 2005/049594, identified herein as EXAMPLES A-L, by determining the ratio of systemic exposure to cellular efficacy. This measure, sometimes reported as AUC/EC_{50}, is well known to those skilled in the art of pharmaceutical drug discovery and drug development as a useful pharmacodynamic predictor of oral efficacy.

The examples of the present disclosure and compounds disclosed in WO 2005/049594 were both tested in an H146 cellular assay and evaluated for oral pharmacokinetic properties in rat, both as previously described herein. The results are shown in TABLES 2 and 3. As can be seen with reference to the data, the compounds of the present disclosure have a more preferred pharmacodynamic profile (meaning that the compounds of the present invention exhibit higher AUC/EC_{50} values) as compared to the compounds known in the art. From these results, a number of observations can be drawn. It can be observed that the compounds having a NO_2 moiety at position W^1 tend to have good to excellent cellular potency (e.g., $EC_{50} < 1$ μM). However, when the pharmacokinetic properties of these same compounds are determined, it can be seen that the systemic exposure after oral administration is poor, resulting in AUC/EC_{50} ratios of from 0.5 to 19.7. On the other hand, when compounds having a CF_3 or CN moiety at position W^1 are tested in the cellular assay, these derivatives have relatively poor cellular efficacy (e.g., $EC_{50} > 1$ μM) even though they have suitable sytstemic exposure after oral administration. Again, this combination provides overall AUC/EC_{50} ratios from about 2.8 to about < 7.4. Surprisingly, compounds of the present disclosure demonstrate cellular efficacy on par with compounds having an NO_2 moiety while maintaining suitable systemic exposure after oral administration. The resulting AUC/EC_{50} ratios for the compounds of the disclosure are from about 20 to about 554.

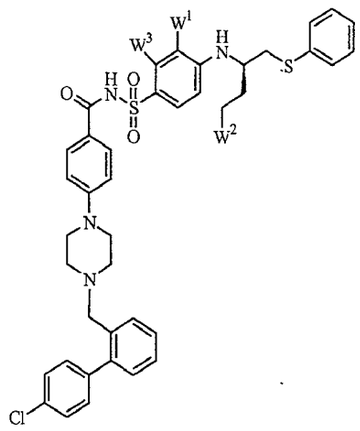
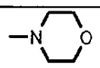


TABLE 2

EXAMPLE	W^1	W^2	W^3	NCI-H146 Cellular Efficacy H146, EC_{50}, (μM)	Pharmacokinetic peak plasma concentration (rat) C_{max}, (μM)	Pharmacokinetic area under the plasma concentration curve (rat) AUC, (μM)	PK/PD ratio AUC/EC_{50}
38	SO_2CF_3	$N(CH_3)_2$	H	0.039	0.072	0.665	16.9
A	CF_3	$N(CH_3)_2$	H	1.599	0.371	4.412	2.8
B	NO_2	$N(CH_3)_2$	H	0.063	0.039	0.283	4.5
C	CN	$N(CH_3)_2$	H	1.807	0.315	1.917	1.1
D	CF_3	$N(CH_3)_2$	F	7.329	0.386	3.827	0.5
39	SO_2CF_3		H	0.083	0.290	1.657	20.0
E	NO_2		H	0.974	0.195	1.157	1.2
F	CF_3		H	> 1.00	0.592	7.365	<7.4

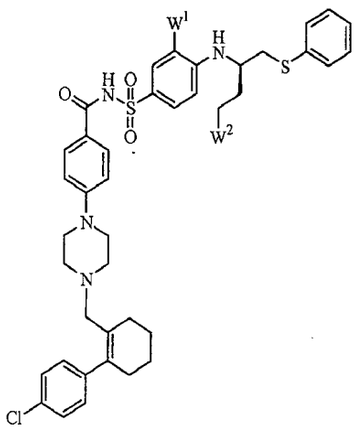
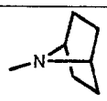
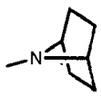


TABLE 3

			NCI-H146 Cellular Efficacy	Pharmacokinetic peak plasma concentration (rat)	Pharmacokinetic area under the plasma concentration Curve (rat)	PK/PD ratio
EXAMPLE	W^1	W^2	H146 EC_{50}, (μM)	C_{max}, (μM)	AUC, (μM)	AUC/EC_{50}
18	SO_2CF_2Cl	$N(CH_3)_2$	0.015	0.059	0.609	39.5
26	SO_2CF_3	$N(CH_3)_2$	0.024	0.097	0.803	33.0
G	NO_2	$N(CH_3)_2$	0.026	0.057	0.507	19.7
H	CF_3	$N(CH_3)_2$	0.410	0.215	1.973	4.8
3	SO_2CF_2Cl		0.029	0.385	4.131	143.6
7	SO_2CF_3		0.059	0.518	3.867	65.6
I	NO_2		0.094	0.267	1.977	21.0
6	SO_2CF_2Cl		0.010	0.113	0.913	91.6
9	SO_2CF_3		0.014	0.156	1.878	137.5
J	NO_2		0.028	0.047	0.402	14.3

8	SO_2CF_3		0.021	0.071	1.098	51.7
K	NO_2		0.049	0.077	0.368	7.5
33	SO_2CF_3	N(*i*-Pr)CH_3	0.038	0.129	3.013	79.8
L	NO_2	N(*i*-Pr)CH_3	0.034	0.0367	0.615	18.2

i-Pr means iso-propyl

As shown in Figures 1-7, studies pertaining to the oral efficacy of EXAMPLE 1 in combination with etoposide, vincristine, CHOP, rituximab, rituximab with CHOP, rapamycin, and VELCADE demonstrated that EXAMPLE 1 synergistically enhanced efficacy of these cytotoxic agents during combination therapy when administered orally.

Further, combinations comprising EXAMPLE 1 and vincristine resulted in 10% complete tumor regression.

Still further, combinations comprising EXAMPLE 1 and rituximab resulted in 70% complete tumor regression whereas no tumor regressions were observed for rituximab alone.

Still further, combinations comprising EXAMPLE 1 and rapamycin resulted in 70% complete tumor regression whereas 10% tumor regressions were observed for rapamycin alone.

Still further, combinations comprising EXAMPLE 1 and rituximab with CHOP resulted in 90% complete tumor regression whereas 10% tumor regressions were observed for rituximab with CHOP only.

Still further, combinations comprising EXAMPLE 1 and bortexomib resulted in 10% complete tumor regression whereas no tumor regressions were observed for bortexomib alone.

Diseases during which anti-apopotic Bcl-X_L protein, anti-apopotic Bcl-2 protein, anti-apopotic Bcl-w protein or a combination thereof, are expressed include, but are not limited to, cancer and autoimmune disorders, wherein cancer includes, but is not limited to, acoustic neuroma, acute leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute myelocytic leukemia (monocytic, myeloblastic, adenocarcinoma, angiosarcoma, astrocytoma, myelomonocytic and promyelocytic), acute t-cell leukemia, basal cell carcinoma, bile duct carcinoma, bladder cancer, brain cancer, breast cancer, bronchogenic carcinoma, cervical cancer, chondrosarcoma, chordoma, choriocarcinoma, chronic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, chronic myelocytic (granulocytic) leukemia, colorectal cancer, craniopharyngioma, cystadenocarcinoma, diffuse large B-cell lymphoma, dysproliferative changes (dysplasias and metaplasias), embryonal carcinoma, endometrial cancer, endotheliosarcoma, ependymoma, epithelial carcinoma, erythroleukemia, esophageal cancer, estrogen-receptor positive breast cancer, essential thrombocythemia, Ewing's tumor, fibrosarcoma, follicular lymphoma, germ cell testicular cancer, glioma, heavy chain disease, hemangioblastoma, hepatoma, hepatocellular cancer, hormone insensitive prostate cancer, leiomyosarcoma, liposarcoma, lung carcinoma, lymphagioendotheliosarcoma, lymphangiosarcoma, lymphoblastic leukemia, lymphoma (Hodgkin's and non-Hodgkin's), malignancies and hyperproliferative disorders of the bladder, breast, colon, lung, ovaries, pancreas, prostate, skin and uterus, lymphoid malignancies of T-cell or B-cell origin, leukemia, lymphoma, medullary carcinoma, medulloblastoma, melanoma, meningioma, mesothelioma, multiple myeloma, myelogenous leukemia, myeloma, myxosarcoma, neuroblastoma, non-small cell lung cancer, oligodendroglioma, oral cancer, osteogenic sarcoma, ovarian cancer, pancreatic cancer, papillary adenocarcinomas, papillary carcinoma, pinealoma, polycythemia vera, prostate cancer, renal cell carcinoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma, sebaceous gland carcinoma, seminoma, small cell lung carcinoma, solid tumors (carcinomas and sarcomas), small cell lung cancer squamous cell carcinoma, synovioma, sweat gland carcinoma, Waldenström's macroglobulinemia, testicular tumors, uterine cancer and Wilms' tumor (*Cancer Res.*, 2000, 60, 6101-10 and *Medicine,* 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia (1985)); autoimmune disorders include, but are not limited to, acquired immunodeficiency disease syndrome, autoimmune lymphoproliferative

syndrome, hemolytic anemia, inflammatory diseases, and thrombocytopenia (*Current Allergy and Asthma Reports* 2003, 3:378-384; *Br. J. Haematol.* 2000 Sep; 110(3): 584-90; Blood 2000 Feb 15;95(4):1283-92; and *New England Journal of Medicine* 2004 Sep; 351(14): 1409-1418).

It is also expected that compounds having formula (II) would inhibit the growth of cells derived from a cancer or neoplasm such as breast cancer (including estrogen-receptor positive breast cancer), colorectal cancer, endometrial cancer, lung cancer (including small cell lung cancer), lymphoma (including follicular or Diffuse Large B-cell), lymphoma (including non-Hodgkin's lymphoma), neuroblastoma, ovarian cancer, prostate cancer (including hormone-insensitive prostate cancer), testicular cancer (including germ cell testicular cancer).

It is also expected that compounds having formula (II) would inhibit the growth of cells derived from a pediatric cancer or neoplasm such as embryonal rhabdomyosarcoma, pediatric acute lymphoblastic leukemia, pediatric acute myelogenous leukemia, pediatric alveolar rhabdomyosarcoma, pediatric anaplastic ependymoma, pediatric anaplastic large cell lymphoma, pediatric anaplastic medulloblastoma, pediatric atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous syatem, pediatric biphenotypic acute leukemia, pediatric Burkitts lymphoma, pediatric cancers of Ewing's family of tumors such as primitive neuroectodermal rumors, pediatric diffuse anaplastic Wilm's tumor, pediatric favorable histology Wilm's tumor, pediatric glioblastoma, pediatric medulloblastoma, pediatric neuroblastoma, pediatric neuroblastoma-derived myelocytomatosis, pediatric pre-B-cell cancers (such as leukemia), pediatric psteosarcoma, pediatric rhabdoid kidney tumor, pediatric rhabdomyosarcoma, and pediatric T-cell cancers such as lymphoma and skin cancer (commonly-owned United States Application Ser No. 10/988,338), *Cancer Res.*, 2000, 60, 6101-10); autoimmune disorders include, but are not limited to, acquired immunodeficiency disease syndrome, autoimmune lymphoproliferative syndrome, hemolytic anemia, inflammatory diseases, and thrombocytopenia (*Current Allergy and Asthma Reports* 2003, 3:378-384; *Br. J. Haematol.* 2000 Sep; 110(3): 584-90; Blood 2000 Feb 15;95(4):1283-92; and *New England Journal of Medicine* 2004 Sep; 351(14): 1409-1418).

Compounds having formula (II) may be made by synthetic chemical processes, examples of which are shown hereinbelow. It is meant to be understood that the order of the steps in the processes may be varied, that reagents, solvents and reaction conditions may be substituted for those specifically mentioned, and that vulnerable moieties may be protected and deprotected, as necessary.

Protecting groups for C(O)OH moieties include, but are not limited to, acetoxymethyl, allyl, benzoylmethyl, benzyl, benzyloxymethyl, tert-butyl, tert-butyldiphenylsilyl, diphenylmethyl, cyclobutyl, cyclohexyl, cyclopentyl, cyclopropyl, diphenylmethylsilyl, ethyl, para-methoxybenzyl, methoxymethyl, methoxyethoxymethyl, methyl, methylthiomethyl, naphthyl, para-nitrobenzyl, phenyl, n-propyl, 2,2,2-trichloroethyl, triethylsilyl, 2-(trimethylsilyl)ethyl, 2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl, triphenylmethyl and the like.

Protecting groups for C(O) and C(O)H moieties include, but are not limited to, 1,3-dioxylketal, diethylketal, dimethylketal, 1,3-dithianylketal, O-methyloxime, O-phenyloxime and the like.

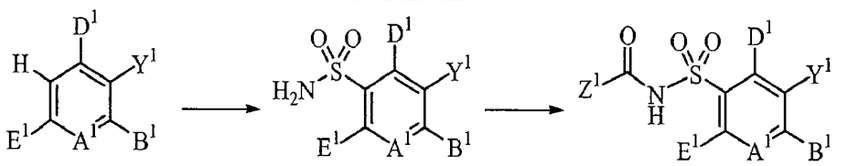
Protecting groups for NH moieties include, but are not limited to, acetyl, alanyl, benzoyl, benzyl (phenylmethyl), benzylidene, benzyloxycarbonyl (Cbz), tert-butoxycarbonyl (Boc), 3,4-dimethoxybenzyloxycarbonyl, diphenylmethyl, diphenylphosphoryl, formyl, methanesulfonyl, para-methoxybenzyloxycarbonyl, phenylacetyl, phthaloyl, succinyl, trichloroethoxycarbonyl, triethylsilyl, trifluoroacetyl, trimethylsilyl, triphenylmethyl, triphenylsilyl, para-toluenesulfonyl and the like.

Protecting groups for OH and SH moieties include, but are not limited to, acetyl, allyl, allyloxycarbonyl, benzyloxycarbonyl (Cbz), benzoyl, benzyl, tert-butyl, tert-butyldimethylsilyl, tert-butyldiphenylsilyl, 3,4-dimethoxybenzyl, 3,4-dimethoxybenzyloxycarbonyl, 1,1-dimethyl-2-propenyl, diphenylmethyl, formyl, methanesulfonyl, methoxyacetyl, 4-methoxybenzyloxycarbonyl, para-methoxybenzyl, methoxycarbonyl, methyl, para-toluenesulfonyl, 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl, 2,2,2-trichloroethyl, triethylsilyl, trifluoroacetyl, 2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl, 2-trimethylsilylethyl, triphenylmethyl, 2-(triphenylphosphonio)ethoxycarbonyl and the like.

The following abbreviations have the meanings indicated.

ADDP means 1,1'-(azodicarbonyl)dipiperidine; AD-mix-β means a mixture of $(DHQD)_2PHAL$, $K_3Fe(CN)_6$, K_2CO_3 and K_2SO_4); AIBN means 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile); 9-BBN means 9-borabicyclo[3.3.1]nonane; $(DHQD)_2PHAL$ means hydroquinidine 1,4-phthalazinediyl diethyl ether; DBU means 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene; DIBAL means diisobutylaluminum hydride; DIEA means diisopropylethylamine; DMAP means N,N-dimethylaminopyridine; DME means 1,2-dimethoxyethane; DMF means N,N-dimethylformamide; dmpe means 1,2-bis(dimethylphosphino)ethane; DMSO means dimethylsulfoxide; dppb means 1,4-bis(diphenylphosphino)butane; dppe means 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane; dppf means 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene; dppm means 1,1-bis(diphenylphosphino)methane; EDAC means 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide; Fmoc means fluorenylmethoxycarbonyl; HATU means O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N'N'N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate; HMPA means hexamethylphosphoramide; IPA means isopropyl alcohol; LDA means lithium diisopropylamide; LHMDS means lithium bis(hexamethyldisilylamide); MP-BH_3 means macroporus triethylammonium methylpolystyrene cyanoborohydride; LAH means lithium aluminum hydride; NCS means N-chlorosuccinimide; PyBOP means benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate; TDA-1 means tris(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)amine; TEA means triethylamine; TFA means trifluoroacetic acid; THF means tetrahydrofuran; NCS means N-chlorosuccinimide; NMM means N-methylmorpholine; NMP means N-methylpyrrolidine; PPh_3 means triphenylphosphine.

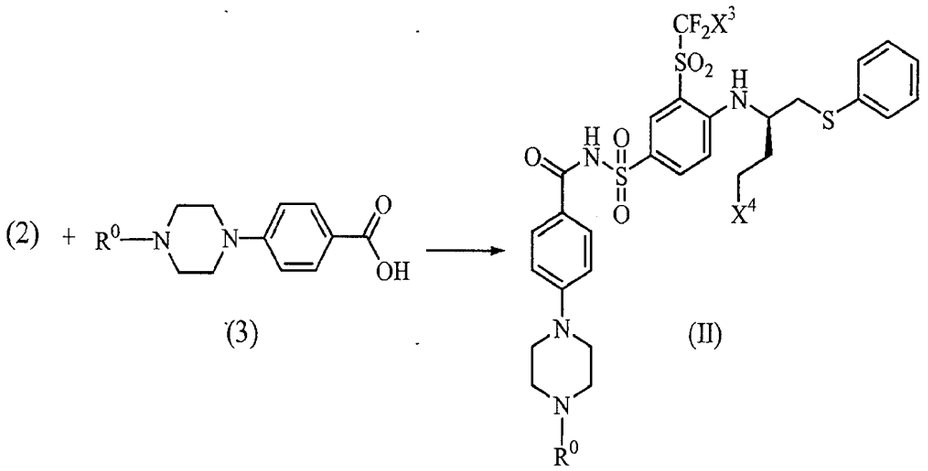
SCHEME 1



(1) (2) (I)

As shown in SCHEME 1, compounds having formula (1) may be converted to compounds having formula (2) by reacting the former, chlorosulfonic acid, and ammonia.

SCHEME 2



Compounds having formula (2) may be converted to compounds having formula (II) by reacting the former and compounds having formula (3) and a coupling agent, with or without a base. Examples of coupling agents include EDCI, CDI, and PyBop. Examples of bases include TEA, DIEA, DMAP, and mixtures thereof.

Compounds having formula (2) may be converted to compounds having formula (II) by reacting the former and compounds having formula Z^1-COCl and the base.

C. Synergistic Combinations of Polyploidy Inducing Agents and Bcl-2 Family Protein Inhibitors for Use in Treating Cancer

In another aspect, the present disclosure relates to the discovery of synergistic combinations of therapeutic agents that are useful in treating patients suffering from cancer. As mentioned previously herein, the inventors of the present disclosure discovered that the induction of polyploidization in certain tumor and cancer cells makes or renders the survival of these resulting polyploid cells dependent on the anti-apoptotic activity of Bcl-X_L. Because these polyploid cells now dependent on Bcl-X_L for their survival, these tumor and cancer cells are sensitized to Bcl-X_L inhibition.

Thus, the present disclosure relates to a combination of therapeutic agents (namely, a combination therapy) that comprise (1) at least one polyploidy inducing agent; and (2) at least one Bcl-2 family protein inhibitor. The at least one polyploidy inducing agent can be an Aurora Kinase inhibitor (such as an Aurora Kinase B inhibitor), a

microtubule inhibitor (such as, for example, Taxotere, vincristine, nocodazole, paclitaxel or colcemid), a pan-kinase inhibitor (such as, for example, staurosporine), an oncolytic virus (such as, for example, ONYX-015), Acridine orange, Dolastain-10, Noscapine, a toposiomerase II inhibitor (such as, for example, ICRF-187 or ICRF-193), 2-{4-[(7-chloro-2-quinoxalinyl)oxy]phenoxy}propionic acid, 2-{4-[(7-bromo-2-quinolinyl)oxy]phenoxy}propionic acid, Platycodin D, a microtubule poison (such as, for example, JG-03-14), an actin polymerization inhibitor (such as, for example, Cytochalasin B), Bistramide A or an antitumor antibiotic (such as, for example, Mithramyicn SKI). An exemplary polyploidy inducing agent is an Aurora Kinase inhibitor. An exemplary Aurora Kinase inhibitor that can be used is an Aurora Kinase B inhibitor. Examples of Aurora Kinase B inhibitors that can be used include, but are not limited to, AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 and Hesperadin. An exemplary Aurora Kinase B inhibitor that can be used is AZD1152.

Methods for determining the induction or evidence of polyploidy in one or more cells can obtained or determined using routine techniques known in the art. For example, evidence of polyploidy can be determined by detected elevated expression of p53. p53 is a surrogate for polyploidization in cells harboring wildtype p53 (See, Gizatullin, F. et al., "The Aurora Kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function," *Cancer Res.* 66, 7668-77. (2006)). Additionally, cells in which polyploidy has been induced exhibit a >4N DNA content, gross morphological increase in cell size and multinucleation, all of which can be detected using routine techniques known in the art.

The at least one Bcl-2 family member inhibitor can be any of the compounds described in Section B herein (such as, for example, ABT-263), ABT-737, Bcl-X_L inhibitors (such as A-1113567 and A-1182848) and combinations thereof. An exemplary Bcl-2 family member inhibitor is ABT-263.

The aforementioned combination of therapeutic agents, namely, the at least one polyploidy agent and the at least one Bcl-2 family protein inhibitor, can be used to treat a patient suffering from at least one type of cancer. Specifically, such treatment methods involve administering a therapeutically effective amount of at least one polyploidy

inducing agent and a therapeutically effective amount of at least one Bcl-2 family protein inhibitor to a patient suffering from cancer and in need of treatment thereof. The order in which the at least one polyploidy inducing agent and the at least one Bcl-2 family protein inhibitor are administered to the patient is not critical. However, because tumor and cancer cells do not become sensitized to Bcl-2 family protein inhibitors until after the induction of polyploidy, it is most beneficial to administer the therapeutically effective amount at least one polyploidy inducing agent to the patient prior to or subsequently with the therapeutically effective amount of at least one Bcl-2 family protein inhibitor.

The therapeutically effective amount of the at least one polyploidy inducing agent and the therapeutically effective amount of the at least one Bcl-2 family protein inhibitor to be administered the patient being treated with the combination of therapeutic agents described herein can be readily determined by those skilled in the art, namely, the treating physician.

An exemplary combination of therapeutic agents for use in treating a patient suffering from cancer involves the use of a therapeutically effective amount of AZD1152 as the polyploidy inducing agent and a therapeutically effective amount of ABT-263 as the Bcl-2 family protein inhibitor.

The aforementioned described combinations of therapeutic agents can be administered to a patient suffering from any type of tumor, cancer, malignancy or combinations thereof. For example, the combination of therapeutic agents can be used to treat a patient suffering from acoustic neuroma, acute leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute myelocytic leukemia (monocytic, myeloblastic, adenocarcinoma, angiosarcoma, astrocytoma, myelomonocytic and promyelocytic), acute t-cell leukemia, basal cell carcinoma, bile duct carcinoma, bladder cancer, brain cancer, breast cancer, bronchogenic carcinoma, cervical cancer, chondrosarcoma, chordoma, choriocarcinoma, chronic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, chronic myelocytic (granulocytic) leukemia, colorectal cancer, craniopharyngioma, cystadenocarcinoma, diffuse large B-cell lymphoma, dysproliferative changes (dysplasias and metaplasias), embryonal carcinoma, endometrial cancer, endotheliosarcoma, ependymoma, epithelial carcinoma, erythroleukemia, esophageal cancer, estrogen-receptor positive breast cancer, essential thrombocythemia, Ewing's tumor, fibrosarcoma, follicular lymphoma, germ cell

testicular cancer, glioma, heavy chain disease, hemangioblastoma, hepatoma, hepatocellular cancer, hormone insensitive prostate cancer, leiomyosarcoma, liposarcoma, lung carcinoma, lymphagioendotheliosarcoma, lymphangiosarcoma, lymphoblastic leukemia, lymphoma (Hodgkin's and non-Hodgkin's), malignancies and hyperproliferative disorders of the bladder, breast, colon, lung, ovaries, pancreas, prostate, skin and uterus, lymphoid malignancies of T-cell or B-cell origin, leukemia, lymphoma, medullary carcinoma, medulloblastoma, melanoma, meningioma, mesothelioma, multiple myeloma, myelogenous leukemia, myeloma, myxosarcoma, neuroblastoma, non-small cell lung cancer, oligodendroglioma, oral cancer, osteogenic sarcoma, ovarian cancer, pancreatic cancer, papillary adenocarcinomas, papillary carcinoma, pinealoma, polycythemia vera, prostate cancer, renal cell carcinoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma, sebaceous gland carcinoma, seminoma, small cell lung carcinoma, solid tumors (carcinomas and sarcomas), small cell lung cancer squamous cell carcinoma, synovioma, sweat gland carcinoma, Waldenström's macroglobulinemia, testicular tumors, uterine cancer and Wilms' tumor (Cancer Res., 2000, 60, 6101-10 and Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia (1985)).

D. Polynucleotide Assays

In connection with the discovery described above in Section C, the inventors of the present disclosure also discovered that tumor and cancer cells (regardless of whether or not these cells have been induced to be polyploid or not) and which contain at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene are immune or exhibit resistance to treatment with a Bcl-2 family protein inhibitor after induction of polyploidy with at least one polyploidy inducing agent. In other words, polyploid tumor and cancer cells which contain at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human

NOXA gene do not exhibit or experience apoptosis or cell death when simultaneously or subsequently treated with at least one Bcl-2 family protein inhibitor.

Thus, in view of this discovery, in another aspect, the present disclosure provides nucleic acid assay methods to detect the presence or absence of at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene by: (i) *in situ* hybridization assays to intact tissue or cellular samples, (ii) microarray hybridization assays to chromosomal DNA extracted from a tissue sample, and (iii) polymerase chain reaction (PCR) or other amplification assays to chromosomal DNA extracted from a tissue sample. Assays using synthetic analogs of nucleic acids, such as peptide nucleic acids, in any of these formats can also be used.

The assays of the disclosure are used to identify at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene for use in both predicting therapy response and for monitoring patient response to polyploidy inducing agent therapy, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of polyploidy inducing agent therapy and a Bcl-2 family protein inhibitor. Assays for response prediction can be run before the administration of at least one polyploidy inducing agent (to induce polyploidy) or after induction of polyploidy but prior to the administration of at least one Bcl-2 family protein inhibitor, and patients that do not show or exhibit showing at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene would be considered eligible for therapy with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor.

For monitoring patient response, the assay can be run at the initiation of therapy (namely at the time of administration of at least one polyploidy inducing agent or after administration of at least one polyploidy inducing agent but prior to the administration of

at least one Bcl-2 family protein inhibitor) to establish the baseline levels of the mutation(s) in the tissue sample, for example, the percent of total cells or number of cells showing at least one mutation in the sample. The same tissue is then sampled and assayed and the amount or number of mutations are then compared to the baseline or predetermined level. Where the number of mutations remains the same or decrease, the therapy is likely being effective and can be continued. Where significant increase in mutations over baseline level occurs, the patient may not be responding or may have developed resistance to continued polyploidy inducing agent therapy, Bcl-2 family protein inhibitor therapy or a combination of polyploidy inducing agent therapy and Bcl-2 family protein inhibitor therapy.

The assays of the disclosure can be used with test samples obtained from a patient suffering from cancers such as, but not limited to, acoustic neuroma, acute leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute myelocytic leukemia (monocytic, myeloblastic, adenocarcinoma, angiosarcoma, astrocytoma, myelomonocytic and promyelocytic), acute t-cell leukemia, basal cell carcinoma, bile duct carcinoma, bladder cancer, brain cancer, breast cancer, bronchogenic carcinoma, cervical cancer, chondrosarcoma, chordoma, choriocarcinoma, chronic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, chronic myelocytic (granulocytic) leukemia, colorectal cancer, craniopharyngioma, cystadenocarcinoma, diffuse large B-cell lymphoma, dysproliferative changes (dysplasias and metaplasias), embryonal carcinoma, endometrial cancer, endotheliosarcoma, ependymoma, epithelial carcinoma, erythroleukemia, esophageal cancer, estrogen-receptor positive breast cancer, essential thrombocythemia, Ewing's tumor, fibrosarcoma, follicular lymphoma, germ cell testicular cancer, glioma, heavy chain disease, hemangioblastoma, hepatoma, hepatocellular cancer, hormone insensitive prostate cancer, leiomyosarcoma, liposarcoma, lung carcinoma, lymphagioendotheliosarcoma, lymphangiosarcoma, lymphoblastic leukemia, lymphoma (Hodgkin's and non-Hodgkin's), malignancies and hyperproliferative disorders of the bladder, breast, colon, lung, ovaries, pancreas, prostate, skin and uterus, lymphoid malignancies of T-cell or B-cell origin, leukemia, lymphoma, medullary carcinoma, medulloblastoma, melanoma, meningioma, mesothelioma, multiple myeloma, myelogenous leukemia, myeloma, myxosarcoma, neuroblastoma, non-small cell lung cancer, oligodendroglioma, oral cancer, osteogenic

sarcoma, ovarian cancer, pancreatic cancer, papillary adenocarcinomas, papillary carcinoma, pinealoma, polycythemia vera, prostate cancer, renal cell carcinoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma, sebaceous gland carcinoma, seminoma, small cell lung carcinoma, solid tumors (carcinomas and sarcomas), small cell lung cancer squamous cell carcinoma, synovioma, sweat gland carcinoma, Waldenström's macroglobulinemia, testicular tumors, uterine cancer and Wilms' tumor (*Cancer Res.*, 2000, 60, 6101-10).

The inventive assays are performed on any type of test sample, such as a patient tissue sample of any type or on a derivative thereof, including peripheral blood, tumor or suspected tumor tissues (including fresh frozen and fixed paraffin-embedded tissue), cell isolates such as circulating epithelial cells separated or identified in a blood sample, lymph node tissue, bone marrow and fine-needle aspirates.

The present disclosure comprises detection of the genomic biomarkers by hybridization assays using detectably labeled nucleic acid-based probes, such as deoxyribonucleic acid (DNA) probes or protein nucleic acid (PNA) probes, or unlabeled primers which are designed/selected to hybridize to a specific chromosomal target. The unlabeled primers are used in amplification assays, such as by polymerase chain reaction (PCR), in which after primer binding, a polymerase amplifies the target nucleic acid sequence for subsequent detection. The detection probes used in PCR or other amplification assays are preferably fluorescent, and still more preferably, detection probes useful in "real-time PCR". Fluorescent labels are also preferred for use *in situ* hybridization but other detectable labels commonly used in hybridization techniques, *e.g.*, enzymatic, chromogenic and isotopic labels, can also be used. Useful probe labeling techniques are described in the literature (Fan, Y.-S. 2002. *Molecular cytogenetics: protocols and applications*. Humana Press, Totowa, N.J. xiv, p. 411, the contents of which are incorporated herein by reference). In detection of the genomic biomarkers by microarray analysis, these probe labeling techniques are applied to label a chromosomal DNA extracted from a patient sample, which is then hybridized to the microarray.

Preferably, *in situ* hybridization is used to detect the presence or absence of at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2

pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene. Exemplary genes for which the presence or absence of at least one mutation is detected is a human BAX gene, a human BAK gene, a human NOXA gene and any combinations thereof. Primer and probes can be made by one of skill in the art using routine techniques in the art or using probes such as those available in commercially available kits, such as the TAQMAN® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) for detecting and/or determining expression of the BAX, BAK and NOXA genes. Examples of TAQMAN® Gene Expression Assays available from Applied Biosystems which can be used are shown below in Table 3.

Table 3

Gene	Applied Biosystems TAQMAN® Gene Expression Assay ID
BAX	Hs99999001_m1
BAK	Hs00940250_g1
NOXA	Hs00560402_m1

Probes for use in the *in situ* hybridization methods of the disclosure fall into two broad groups: chromosome enumeration probes, *i.e.*, probes that hybridize to a chromosomal region, usually a repeat sequence region, and indicate the presence or absence of an entire chromosome; and locus specific probes, *i.e.*, probes that hybridize to a specific locus on a chromosome and detect the presence or absence of a specific locus. Chromosome arm probes, *i.e.*, probes that hybridize to a chromosomal region and indicate the presence or absence of an arm of a specific chromosome, can also be used. It is preferred to use a locus specific probe that can detect changes of the unique chromosomal DNA sequences at the interrogated locus, such as, for example, one or more of human BAX, BAK and NOXA loci. Methods for use of unique sequence probes for *in situ* hybridization are described in U.S. Patent No. 5,447,841, the contents of which are incorporated herein by reference.

A chromosome enumeration probe can hybridize to a repetitive sequence, located either near or removed from a centromere, or can hybridize to a unique sequence located at any position on a chromosome. For example, a chromosome enumeration probe can hybridize with repetitive DNA associated with the centromere of a chromosome.

Centromeres of primate chromosomes contain a complex family of long tandem repeats of DNA comprised of a monomer repeat length of about 171 base pairs, that are referred to as alpha- satellite DNA. Centromere fluorescent *in situ* hybridization probes to each of chromosomes 14 and 18 are commercially available from Abbott Molecular (Des Plaines, IL).

Exceptionally useful *in situ* hybridization probes are directly labeled fluorescent probes, such as described in U.S. Patent No. 5,491,224, incorporated herein by reference. U.S. Patent No. 5,491,224 also describes simultaneous FISH assays using more than one fluorescently labeled probe.

Useful locus specific probes can be produced in any manner and generally contain sequences to hybridize to a chromosomal DNA target sequence of about 10,000 to about 1,000,000 bases long. Preferably the probe hybridizes to a target stretch of chromosomal DNA at the target locus of at least 100,000 bases long to about 500,000 bases long and also includes unlabeled blocking nucleic acid in the probe mix, as disclosed in U.S. Patent No. 5,756,696, the contents of which are herein incorporated by reference, to avoid non-specific binding of the probe. It is also possible to use unlabeled, synthesized oligomeric nucleic acid or peptide nucleic acid as the blocking nucleic acid. For targeting the particular gene locus, it is preferred that the probes include nucleic acid sequences that span the gene and thus hybridize to both sides of the entire genomic coding locus of the gene. The probes can be produced starting with human DNA-containing clones such as Bacterial Artificial Chromosomes (BAC's) or the like. BAC libraries for the human genome are available from Invitrogen (Carlsbad, CA) and can be investigated for identification of useful clones. It is preferred to use the University of California Santa Cruz Genome Browser to identify DNA sequences in the target locus. These DNA sequences can then be used to synthesize PCR primers to screen BAC libraries to identify useful clones. The clones can then be labeled by conventional nick translation methods and tested as *in situ* hybridization probes.

Examples of fluorophores that can be used in the *in situ* hybridization methods described herein are: 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid (AMCA); Texas Red™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR); 5-(and-6)-carboxy-X-rhodamine; lissamine rhodamine B; 5-(and-6)-carboxyfluorescein; fluorescein-5-isothiocyanate (FITC); 7-

diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid, tetramethyl-rhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate; 5-(and-6)-carboxytetramethylrhodamine; 7-hydroxy-coumarin-3-carboxylic acid; 6-[fluorescein 5-(and-6)-carboxamido]hexanoic acid; N-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,.4a diaza-3-indacenepropionic acid; eosin-5-isothiocyanate; erythrosine-5-isothiocyanate; 5-(and–6)-carboxyrhodamine 6G; and Cascade™ blue aectylazide (Molecular Probes; an Invitrogen brand).

Probes can be viewed with a fluorescence microscope and an appropriate filter for each fluorophore, or by using dual or triple band-pass filter sets to observe multiple fluorophores. See, for example, U.S. Patent No. 5,776,688, the contents of which are incorporated herein by reference. Any suitable microscopic imaging method can be used to visualize the hybridized probes, including automated digital imaging systems. Alternatively, techniques such as flow cytometry can be used to examine the hybridization pattern of the chromosomal probes.

Although the cell-by-cell gene amplification analysis resulting from *in situ* hybridization is preferred, the genomic biomarkers can also be detected by quantitative PCR. In this embodiment, DNA is extracted from the tissue sample, and is then amplified by PCR using a pair of primers specific to at least one of (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human BH3 encoding gene (such as a human BID gene, a human NOXA gene, a human PUMA gene, a human BIK gene, a human BIM gene and a human BAD gene), or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and in a human BH3 encoding gene (such as a human BID gene, a human NOXA gene, a human PUMA gene, a human BIK gene, a human BIM gene and a human BAD gene), or by multiplex PCR, using multiple pairs of primers. Any primer sequence for the biomarkers can be used. Examples of primers that can be used are shown below in Table 4. The presence of at least one mutation is then determined by comparison to a reference amplification standard.

Table 4

SEQUENCE	GENE
sense: 5'-GATGGACGGGTCCGGAGA-3' (SEQ ID NO:1); antisense: 5'-CTCAGCCCATCTTCTTCCAG-3' (SEQ ID NO:2)	BAX

sense: 5'-TGGTTATGGGATGGGTGAGG (SEQ ID NO:3); antisense: 5' – CTGCTTTTTCTCGCCCTTCC – 3' (SEQ ID NO:4)	BAK
sense: 5'-TCCGAGGTGCTCCAGTTGGAGGC-3' (SEQ ID NO:5); antisense: 5'-GCCCGGCCTGGGTCTTTCGC-3' (SEQ ID NO:6)	NOXA

Microarray-based copy number analysis can also be used. In this embodiment, the chromosomal DNA after extraction is labeled for hybridization to a microarray comprising a substrate having multiple immobilized unlabeled nucleic acid probes arrayed at probe densities up to several million probes per square centimeter of substrate surface. Multiple microarray formats exist and any of these can be used, in the present disclosure. Examples of microarrays that can be used are the Affymetrix GeneChip® Mapping 100K Set SNP Array (See Matsuzaki, H., et al., "Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays," *Nat Methods*. 1:109-11 (2004)); the Affymetrix GeneChip® Mapping 250K Assay Kits (such as the GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array or the GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array) or the Affymetrix GeneChip® Mapping 500K Array Set, each of which is commercially available from Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA), the Agilent Human Genome aCGH Microarray 44B (available from Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA), Illumina microarrays (Illumina, Inc., San Diego, CA), Nimblegen aCGH microarrays (Nimblegen, Inc., Madison, WI), *etc*. When using an oligonucleotide microarray to detect amplifications, it is preferred to use a microarray that has probe sequences to more than three separate locations in the targeted region. Examples of probes that can be used in the microarray are shown in below Table 5

Table 5

SEQUENCE	GENE	SEQ ID NO:
CTTCAATTTTCAAATCAAACTGATC (SNP_A-1936181)	BAX	SEQ ID NO:7
TGAATGCTTTGATTTCCTCACGTTT(SNP_A-2237715)	BAK	SEQ ID NO:8
TTGCCTGAACATCTTGGACATTTTT (SNP_A-1815502)	NOXA	SEQ ID NO:9

E. Detecting Expression: mRNA

The level of gene expression for (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene gene can be determined by assessing the amount of one or more mRNAs in the test sample. Methods of measuring mRNA in samples are known in the art. To measure mRNA levels, the cells in a test sample can be lysed, and the levels of mRNA in the lysates or in RNA purified or semi-purified from lysates can be measured by any variety of methods familiar to those in the art. Such methods include hybridization assays using detectably labeled DNA or RNA probes (*i.e.*, Northern blotting) or quantitative or semi-quantitative RT-PCR methodologies using appropriate oligonucleotide primers. Alternatively, quantitative or semi-quantitative *in situ* hybridization assays can be carried out using, for example, tissue sections, or unlysed cell suspensions, and detectably labeled (*e.g.,* fluorescent, or enzyme-labeled) DNA or RNA probes. Additional methods for quantifying mRNA include RNA protection assay (RPA), cDNA and oligonucleotide microarrays, representation difference analysis (RDA), differential display, EST sequence analysis, and serial analysis of gene expression (SAGE).

In suitable embodiments, PCR amplification is used to detect for at least one mutation in a (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene in the test sample. Briefly, in PCR, two primer sequences are prepared that are complementary to regions on opposite complementary strands of the marker sequence, for example containing the sequences for (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene. An excess of deoxynucleotide triphosphates are added to a reaction mixture along with a DNA polymerase, *e.g.*, Taq polymerase. If the target sequence is present in a sample, the

primers will bind to the sequence and the polymerase will cause the primers to be extended along the marker sequence by adding on nucleotides. By raising and lowering the temperature of the reaction mixture, the extended primers will dissociate from the marker to form reaction products, excess primers will bind to the marker and to the reaction products and the process is repeated, thereby generating amplification products. A reverse transcriptase PCR amplification procedure can be performed in order to quantify the amount of mRNA amplified.

Any suitable fragment of (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene can be amplified and detected. Designing efficient primers for PCR is within the ordinary skill in the art. Typically, amplified fragments for detection are approximately 50 to 300 nucleotides in length.

Amplification products can be detected in several ways. Amplification products can be visualized by electrophoresis of the sample in a gel and then staining with a DNA binding dye, *e.g.,* ethidium bromide. Alternatively, the amplification products can be integrally labeled with a radioactive or fluorescent nucleotide and then visualized using x-ray film or under the appropriate stimulating spectra.

Amplification can be also monitored using "real-time" methods. Real-time PCR allows for the detection and quantitation of a nucleic acid target. Typically, this approach to quantitative PCR utilizes a fluorescent dye, which can be a double-strand specific dye, such as SYBR GREEN®. Alternatively, other fluorescent dyes (*e.g.,* FAM or HEX) can be conjugated to an oligonucleotide probe or a primer. Various instruments capable of performing real time PCR are known in the art and include, for example, the ABI PRISM® 7900 (Applied Biosystems) and LIGHTCYCLER® systems (Roche). The fluorescent signal generated at each cycle of PCR is proportional to the amount of PCR product. A plot of fluorescence versus cycle number is used to describe the kinetics of amplification and a fluorescence threshold level is used to define a fractional cycle number related to initial template concentration. When amplification is performed and detected on an instrument capable of reading fluorescence during thermal cycling, the intended PCR product from non-specific PCR products can be differentiated using

melting analysis. By measuring the change in fluorescence while gradually increasing the temperature of the reaction subsequent to amplification and signal generation it can be possible to determine the Tm of the intended product(s) as well as that of the nonspecific product.

The methods can include amplifying multiple nucleic acids in sample, also known as "multiplex detection" or "multiplexing." Multiplex PCR" refers to PCR that involves adding more than one set of PCR primers to the reaction in order to detect and quantify multiple nucleic acids, including nucleic acids from one or more target gene markers. Furthermore, multiplexing with an internal control (*e.g.*, 18S rRNA, GADPH, or actin) provides a control for the PCR without reaction.

F. Sample Processing and Assay Performance

As discussed previously herein, the test sample of the present disclosure can be a tissue sample. The tissue sample to be assayed by the methods of the present disclosure can comprise any type, including a peripheral blood sample, a tumor tissue or a suspected tumor tissue, a thin layer cytological sample, a fine-needle aspirate sample, a bone marrow sample, a lymph node sample, a urine sample, an ascites sample, a lavage sample, an esophageal brushing sample, a bladder or lung wash sample, a spinal fluid sample, a brain fluid sample, a ductal aspirate sample, a nipple discharge sample, a pleural effusion sample, a fresh frozen tissue sample, a paraffin embedded tissue sample or an extract or processed sample produced from any of a peripheral blood sample, a tumor tissue or a suspected tumor tissue, a thin layer cytological sample, a fine needle aspirate sample, a bone marrow sample, a lymph node sample, a urine sample, an ascites sample, a lavage sample, an esophageal brushing sample, a bladder or lung wash sample, a spinal fluid sample, a brain fluid sample, a ductal aspirate sample, a nipple discharge sample, a pleural effusion sample, a fresh frozen tissue sample or a paraffin embedded tissue sample. For example, a patient peripheral blood sample can be initially processed to extract an epithelial cell population, and this extract can then be assayed. A microdissection of the tissue sample to obtain a cellular sample enriched with suspected tumor cells can also be used. The preferred tissue samples for use herein are peripheral

blood, tumor tissue or suspected tumor tissue, including fine needle aspirates, fresh frozen tissue and paraffin embedded tissue, and bone marrow.

The tissue sample can be processed by any desirable method for performing *in situ* hybridization or other nucleic acid assays. For the preferred *in situ* hybridization assays, a paraffin embedded tumor tissue sample or bone marrow sample is fixed on a glass microscope slide and deparaffinized with a solvent, typically xylene. Useful protocols for tissue deparaffinization and *in situ* hybridization are available from Abbott Molecular Inc. (Des Plaines, Illinois). Any suitable instrumentation or automation can be used in the performance of the inventive assays. PCR based assays can be performed on the m2000 instrument system (Abbott Molecular, Des Plaines, IL). Automated imaging can be used for the preferred fluorescent *in situ* hybridization assays.

In one embodiment, the sample comprises a peripheral blood sample from a patient which is processed to produce an extract of circulating tumor or cancer cells to be examined for the presence or absence of at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene. The circulating tumor cells can be separated by immunomagnetic separation technology such as that available from Immunicon (Huntingdon Valley, Pennsylvania). The at least one mutation is determined for the circulating tumor cells is then compared to the baseline level or predetermined level of circulating tumor cells having a determination made of the presence or absence of one or more mutations determined at a previous point in time, such as at the start of therapy. Increases or the presence of at least one mutation compared to the baseline level or the predetermined level can indicate therapy failure.

Test samples can comprise any number of cells that is sufficient for a clinical diagnosis, and typically contain at least about 100 cells. In a typical FISH assay, the hybridization pattern is assessed in about 25-1,000 cells. Test samples are typically considered "test positive" when found to contain the gene amplification in a sufficient proportion of the sample. The number of cells identified with at least one mutation and used to classify a particular sample as positive, in general, varies with the number of cells in the sample. The number of cells used for a positive classification is also known as the

cut-off value. Examples of cut-off values that can be used in the determinations include about 5, 25, 50, 100 and 250 cells, or 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50% and 60% of cells in the sample population. As low as one cell can be sufficient to classify a sample as positive. In a typical paraffin embedded tissue sample, it is preferred to identify at least 30 cells as positive and more preferred to identify at least 20 cells as positive for having at least one mutation. For example, detection in a typical paraffin embedded colorectal carcinoma of 30 cells would be sufficient to classify the tissue as positive and eligible for treatment.

G. Kits

The present disclosure also contemplates a variety of kits. In one aspect, the kit contains at least the following two therapeutic agents: (1) at least polyploidy inducing agent; and (2) at least one Bcl-2 family protein inhibitor. In addition, the kit can optionally include instructions for use, namely, the administration of the at least two therapeutic agents to a patient suffering from cancer and need of treatment thereof. These instructions may be provided in paper form or in computer-readable form, such as a disc, CD, DVD or the like.

In another aspect, the kit of the present disclosure is a kit for detecting the presence or absence of at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene in a test sample. Exemplary genes for which the presence or absence of at least one mutation is detected using said kit is a human BAX gene, a human BAK gene, a human NOXA gene and any combinations thereof. Such kits can comprise one or more reagents for determining the presence or absence of the above described at least one mutation. For example, said kit can contain one or more nucleic acid probes. Alternatively, or in addition to the probes, the kit can contain one or more nucleic acid primers.

Thus, the present disclosure further provides for diagnostic and quality control kits comprising one or more nucleic acid primers, nucleic acid probes or nucleic acid primers and probes described herein. Optionally the assays, kits and kit components of

the present disclosure can be optimized for use on commercial platforms (*e.g.*, immunoassays on the PRISM®, AxSYM®, ARCHITECT® and EIA (Bead) platforms of Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, as well as other commercial and/or in vitro diagnostic assays). Additionally, the assays, kits and kit components can be employed in other formats, for example, on electrochemical or other hand-held or point-of-care assay systems. The present disclosure is, for example, applicable to the commercial Abbott Point of Care (i-STAT®, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) electrochemical immunoassay system that performs sandwich immunoassays for several cardiac markers, including TnI, CKMB and BNP. Immunosensors and methods of operating them in single-use test devices are described, for example, in U.S. Patent Application Publication Nos. 2003/0170881, 2004/0018577, 2005/0054078 and 2006/0160164, which are incorporated herein by reference. Additional background on the manufacture of electrochemical and other types of immunosensors is found in U.S. Patent No. 5,063,081 which is also incorporated by reference for its teachings regarding same.

Optionally the kits include quality control reagents (*e.g.*, sensitivity panels, calibrators, and positive controls). Preparation of quality control reagents is well known in the art, and is described, *e.g.*, on a variety of immunodiagnostic product insert sheets.

The kit can incorporate a detectable label, such as a fluorophore, radioactive moiety, enzyme, biotin/avidin label, chromophore, chemiluminescent label, or the like, or the kit may include reagents for labeling the nucleic acid primers, the nucleic acid probes or the nucleic acid primers and nucleic acid probes for detecting the presence or absence of at least one mutation as described herein. The primers and/or probes, calibrators and/or controls can be provided in separate containers or pre-dispensed into an appropriate assay format, for example, into microtiter plates.

The kits can optionally include other reagents required to conduct a diagnostic assay or facilitate quality control evaluations, such as buffers, salts, enzymes, enzyme co-factors, substrates, detection reagents, and the like. Other components, such as buffers and solutions for the isolation and/or treatment of a test sample (*e.g.*, pretreatment reagents), may also be included in the kit. The kit may additionally include one or more other controls. One or more of the components of the kit may be lyophilized and the kit

may further comprise reagents suitable for the reconstitution of the lyophilized components.

The various components of the kit optionally are provided in suitable containers. As indicated above, one or more of the containers may be a microtiter plate. The kit further can include containers for holding or storing a sample (*e.g.*, a container or cartridge for a blood or urine sample). Where appropriate, the kit may also optionally contain reaction vessels, mixing vessels and other components that facilitate the preparation of reagents or the test sample. The kit may also include one or more instruments for assisting with obtaining a test sample, such as a syringe, pipette, forceps, measured spoon, or the like.

The kit further can optionally include instructions for use, which may be provided in paper form or in computer-readable form, such as a disc, CD, DVD or the like.

H. Adaptation of Kits

The kit (or components thereof), as well as the method of determining the presence or absence of at least one mutation in (i) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene), (ii) a human NOXA gene, or (iii) a human Bcl-2 pro-apoptotic encoding gene (such as a human BAX gene and a human BAK gene) and a human NOXA gene using the components and methods described herein, can be adapted for use in a variety of automated and semi-automated systems (including those wherein the solid phase comprises a microparticle), as described, *e.g.*, in U.S. Patent Nos. 5,089,424 and 5,006,309, and as commercially marketed, *e.g.*, by Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) as ARCHITECT®.

Some of the differences between an automated or semi-automated system as compared to a non-automated system (*e.g.*, ELISA) include the substrate to which the first specific binding partner (*e.g.*, capture antibody) is attached (which can impact sandwich formation and analyte reactivity), and the length and timing of the capture, detection and/or any optional wash steps. Whereas a non-automated format such as an ELISA may require a relatively longer incubation time with sample and capture reagent (*e.g.*, about 2 hours) an automated or semi-automated format (*e.g.*, ARCHITECT®, Abbott Laboratories) may have a relatively shorter incubation time (*e.g.*, approximately

18 minutes for ARCHITECT®). Similarly, whereas a non-automated format such as an ELISA may incubate a detection antibody such as the conjugate reagent for a relatively longer incubation time (*e.g.*, about 2 hours), an automated or semi-automated format (*e.g.*, ARCHITECT®) may have a relatively shorter incubation time (*e.g.*, approximately 4 minutes for the ARCHITECT®).

Other platforms available from Abbott Laboratories include, but are not limited to, AxSYM®, IMx® (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,294,404, which is hereby incorporated by reference in its entirety), PRISM®, EIA (bead), and Quantum™ II, as well as other platforms. Additionally, the assays, kits and kit components can be employed in other formats, for example, on electrochemical or other hand-held or point-of-care assay systems. The present disclosure is, for example, applicable to the commercial Abbott Point of Care (i-STAT®, Abbott Laboratories) electrochemical immunoassay system that performs sandwich immunoassays. Immunosensors and their methods of manufacture and operation in single-use test devices are described, for example in, U.S. Patent No. 5,063,081, U.S. Patent. Application Publication Nos. 2003/0170881, 2004/0018577, 2005/0054078, and 2006/0160164, which are incorporated in their entireties by reference for their teachings regarding same.

It further goes without saying that the methods and kits as described herein necessarily encompass other reagents and methods for carrying out the assays. For instance, encompassed are various buffers such as are known in the art and/or which can be readily prepared or optimized to be employed.

The following examples are presented to provide what is believed to be the most useful and readily understood description of procedures and conceptual aspects of this disclosure.

EXAMPLE 1A

3-(R)-((Carbobenzyloxy)amino)-γ-butyrolactone, prepared as described in J. Am. Chem. Soc. 1986, 108, 4943-4952, (62 g) and morpholine (46 mL) in dioxane (700 mL) at 65°C was stirred for 24 hours, cooled and concentrated. The concentrate was chromatographed on silica gel with 10% methanol/ethyl acetate.

EXAMPLE 1B

EXAMPLE 1A (16.5 g), diphenyl disulfide (14.5 g) and tributylphosphine (16.6 mL) in toluene (250 mL) at 80°C was stirred for 24 hours, cooled and concentrated. The concentrate was chromatographed on silica gel with 1:1 ethyl acetate/hexanes.

EXAMPLE 1C

EXAMPLE 1B (18 g) in 30% HBr in acetic acid (250 mL) at 25°C was stirred for 24 hours, concentrated, poured into 1M HCl and extracted with diethyl ether. The extract was extracted with 1M HCl, and this extract was cooled to 0°C, adjusted to pH 12 with KOH and extracted with dichloromethane. The extract was washed with brine and dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated.

EXAMPLE 1D

EXAMPLE 1C (45.4 g) in THF (500 mL) at 55°C was treated with 1M BH_3·THF (650 mL) over 2 hours, stirred for 24 hours, cooled to 0°C, treated with methanol (80 mL), poured into methanol (500 mL) and concentrated. A mixture of the concentrate in methanol (400 mL) was treated with a HCl-saturated methanol (800 mL), refluxed for 24 hours, cooled, concentrated, poured into 2M NaOH and extracted with ethyl acetate. The extract was washed with 1M NaOH and brine and dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated. The concentrate was chromatographed on silica gel with ethyl acetate 10% methanol/ethyl acetate and 10% methanol/10% acetonitrile/5% TEA/75% ethyl acetate.

EXAMPLE 1E

Methyl viologen hydrochloride (1.17 g) in DMF (80 mL) at 25°C was saturated with trifluoromethyl iodide, treated with 2-fluorobenzenethiol (9.7 mL) and TEA (20 mL), stirred for 24 hours, diluted with water (240 mL) and extracted with diethyl ether. The extract was washed with 1M NaOH, saturated ammonium chloride and brine and concentrated.

EXAMPLE 1F

EXAMPLE 1E (17.346 g) in 1:1:2 carbon tetrachloride/acetonitrile/water (800 mL) at 25°C was treated with sodium periodate (56.8 g) and ruthenium(III) chloride hydrate (183 mg), stirred for 18 hours, diluted with dichloromethane (100 mL) and filtered through diatomaceous earth (Celite®). The filtrate was washed with saturated sodium bicarbonate and extracted with dichloromethane. The extract was washed with brine and dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated. The concentrate was filtered through silica gel.

EXAMPLE 1G

EXAMPLE 1F (37.3 g) in chlorosulfonic acid (32.8 mL) at 120°C was stirred for 18 hours, cooled to 25°C and pipetted onto crushed ice. The mixture was extracted with ethyl acetate, and the extract was washed with water and brine and dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated.

EXAMPLE 1H

EXAMPLE 1G (23 g) in isopropanol (706 mL) at -78°C was treated with ammonium hydroxide (98 mL) over 1 hour, stirred for 1 hour, quenched with 6M HCl (353 mL), warmed to 25°C and concentrated. The concentrate was mixed with water and extracted with ethyl acetate. The extract was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated. The concentrate was recrystallized from ethyl acetate/hexane.

EXAMPLE 1I

EXAMPLE 1H (13.48 g) and EXAMPLE 1D (11.56 g) in THF (218 mL) was treated with DIEA (15.1 mL), stirred at 50°C for 4 hours, cooled, treated with saturated sodium bicarbonate and extracted with ethyl acetate. The extract was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated. The concentrate was recrystallized from hexanes/ethyl acetate.

EXAMPLE 1J

DMF (10 mL) and chloroform (80 mL) at 3°C was treated with PBr_3 (12 mL), stirred for 20 minutes at 25°C, treated with 4,4-dimethylcyclohexanone (7.15 g) in chloroform (50 mL), stirred for 18 hours, poured onto ice, neutralized with solid sodium bicarbonate and extracted with diethyl ether. The extract was washed with brine and dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated. The concentrate was chromatographed on silica gel with 0-10% ethyl acetate/hexanes.

EXAMPLE 1K

EXAMPLE 1J (1.7 g) and 4-piperazin-1-ylbenzoic acid ethyl ester (1.9 g) in methanol (30 mL) was treated with sodium cyanoborohydride (0.6 g), adjusted to pH 5 with acetic acid, stirred for 18 hours and filtered through diatomaceous earth (Celite®). The filtrate was concentrated, and the concentrate was chromatographed on silica gel on silica gel with 10-30% ethyl acetate/hexanes.

EXAMPLE 1L

EXAMPLE 1K (1.1 g), 4-chlorophenylboronic acid (0.6 g), 2M Na_2CO_3 (2 mL) and $PdCl_2(PPh_3)_2$ (0.1 g) in 7:3:2 DME/water/ethanol (20 mL) was stirred at 85°C for 18 hours, filtered through diatomaceous earth (Celite®) and concentrated. The concentrate was chromatographed on silica gel with 10-30% ethyl acetate/hexanes.

EXAMPLE 1M

EXAMPLE 1L (4.59 g) and LiOH (1.25 g) in dioxane (75 mL) and water (10 mL) was stirred at 100°C for 18 hours, cooled to 25°C and concentrated. The concentrate was disolved in water, heated to reflux, neutralized with 1M HCl (28.5 mL), cooled to 25°C, filtered and concentrated.

EXAMPLE 1N

EXAMPLE 1M (31.5 g), EXAMPLE 1I (39.93 g), EDAC·HCl (20.60 g) and DMAP (13.15 g) in dichloromethane (500 mL) at 25°C was stirred for 18 hours, diluted with dichloromethane, washed with saturated ammonium chloride and brine and dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated. The concentrate was chromatographed on silica gel with 0-10% methanol/ammonia-saturated dichloromethane. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 8.12 (d, 1H), 7.94 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.38 (d, 2H), 7.30 (m, 4H), 7.18 (m, 1H), 7.12 (d, 2H), 6.98 (d, 1H), 6.85 (d, 3H), 4.07 (m, 1H), 3.53 (br, 4H), 3.28 (m, 12H), 2.44 (m, 8H), 1.99 (m, 3H), 1.80 (m, 1H), 1.44 (t, 2H), 0.97 (s, 6H).

EXAMPLE 2A

Powdered NaOH (31.2 g), TDA-1 (5 mL) and 2-fluorobenzene thiol (33.6 mL) in benzene (400 mL) was saturated with chlorodifluoromethane, stirred at 80°C for 30 minutes and filtered through diatomaceous earth (Celite®). The filtrate was washed with saturated $NaHCO_3$ and the water layer was extracted with diethyl ether. The extracts were combined and dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated.

EXAMPLE 2B

EXAMPLE 2A (46 g) in 1:1:2 CCl_4/CH_3CN/water (1.2L) at 25°C was treated with $NaIO_4$ (165.6 g) and $RuCl_3 \cdot xH_2O$ (534 mg), stirred for 18 hours, diluted with dichloromethane and filtered through diatomaceous earth (Celite®). The filtrate was washed with saturated $NaHCO_3$ and dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated. The concentrate was filtered through silica gel.

EXAMPLE 2C

EXAMPLE 2B (25 g) and NCS (17.55 g) in THF (700 mL) at -78 °C was treated with LHMDS (178.5 mL) over 1 hour, stirred for 1 hour and quenched with ammonium chloride. The mixture was extracted with ethyl acetate, and the extract was washed with brine and dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated. The concentrate was chromatographed on silica gel with 0-5% ethyl acetate/hexanes.

EXAMPLE 2D

EXAMPLE 2C (44 g) in chlorosulfonic acid (36.7 mL) at 120°C was stirred for 18 hours, cooled to 25°C, pipetted onto crushed ice and extracted with ethyl acetate. The extract was washed with water and brine and dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated.

EXAMPLE 2E

EXAMPLE 2D (22 g) in isopropanol (700 mL) at -78 °C was treated with aqueous ammonia (90 mL) over 1 hour, stirred for another hour, quenched with 6M HCl (300 mL), warmed to 25°C and concentrated. The concentrate was mixed with water and extracted with ethyl acetate. The extract was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated. The concentrate was recrystallized from hexanes/ethyl acetate.

EXAMPLE 2F

EXAMPLE 2E (2.89 g) and EXAMPLE 1D (2.39 g) in THF (20 mL) was treated with diisopropylethylamine (3.2 mL), stirred at 60°C for 18 hours, cooled, treated with saturated sodium bicarbonate and extracted with ethyl acetate. The extract was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated. The concentrate was chromatographed on silica gel with 1.5-5% 7M ammonia in methanol/dichloromethane.

EXAMPLE 2G

Hexane-washed 60% oily NaH (17 g) in dichloromethane (300 mL) at -5°C was treated with 4,4-dimethyl-2-oxo-cyclohexanecarboxylic acid methyl ester, prepared as described in Tetrahedron (1992), 48 (21), 4459-64, (53.89 g), stirred for 30 minutes, cooled to -78°C, treated with trifluoromethanesulfonic anhydride, warmed to 25°C, stirred for 18 hours, washed with brine and dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated.

EXAMPLE 2H

EXAMPLE 2G (86 g), 4-chlorophenylboronic acid (50 g), CsF (104 g) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (2.5 g) in 2:1 DME/methanol (600 mL) at

70°C was stirred for 18 hours and concentrated. The concentrate was dissolved in diethyl ether, and the solution was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated. The concentrate was filtered through silica gel with 20% ethyl acetate/hexanes.

EXAMPLE 2I

Lithium borohydride (18 g) was treated with EXAMPLE 2H (76 g) in diethyl ether (400 mL) and methanol (23 mL), stirred at reflux for 4 hours, cooled, quenched with 1M HCl, diluted with water and extracted with diethyl ether. The extract was dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated. The concentrate was chromatographed on silica gel with 0-30% ethyl acetate/hexanes.

EXAMPLE 2J

EXAMPLE 2I (17.5 g) in dichloromethane (100 mL) at 0°C was treated simultaneously with methanesulfonyl chloride (5.6 mL) and TEA (21 mL), stirred for 5 minutes, treated with 4-piperazin-1-ylbenzoic acid ethyl ester (17 g), stirred at 25°C for 18 hours, washed with ammonium chloride and dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated. The concentrate was chromatographed on silica gel with 10% ethyl acetate/hexanes.

EXAMPLE 2K

This example was prepared by substituting EXAMPLE 2J for EXAMPLE 1L in EXAMPLE 1M.

EXAMPLE 2L

EXAMPLE 2K (16.9 g) and EXAMPLE 2F (22 g) in dichloromethane (200 mL) at 25°C was treated with EDAC·HCl (11.06 g) and DMAP (7.06 g), stirred for 18 hours, diluted with dichloromethane (400 mL), washed with saturated ammonium chloride and brine and dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated. The concentrate was chromatographed on silica gel with 0-10% methanol/ammonia-saturated dichloromethane. ^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 8.07 (d, 1H), 7.90 (dd, 1H), 7.71

(d, 2H), 7.36 (m, 4H), 7.29 (m, 2H), 7.20 (m, 1H), 7.09 (d, 2H), 6.86 (d, 1H), 6.80 (d, 2H), 6.76 (d, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.50 (m, 4H), 3.33 (m, 2H), 3.16 (m, 4H), 2.81 (s, 2H), 2.29 (m, 12H), 1.99 (s, 2H), 1.94 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.42 (t, 2H), 0.96 (s, 6H).

EXAMPLE 3A

This example was prepared by substituting 2-bromo-cyclohex-1-enecarbaldehyde, prepared as described in Collect. Czech. Chem. Commun., 1961, 26, 3059.) for EXAMPLE 1J in EXAMPLE 1K.

EXAMPLE 3B

This example was prepared by substituting EXAMPLE 3A for EXAMPLE 1K in EXAMPLE 1L.

EXAMPLE 3C

This example was prepared by substituting EXAMPLE 3B for EXAMPLE 1L in EXAMPLE 1M.

EXAMPLE 3D

This example was prepared by substituting EXAMPLE 3C and EXAMPLE 2F for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 8.11 (d, 1H), 7.92 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.37 (d, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.27 (t, 2H), 7.18 (t, 1H), 7.12 (d, 2H), 6.94 (d, 1H), 6.84 (m, 3H), 4.04 (m, 1H), 3.51 (br, 4H), 3.27 (br, 10H), 2.84 (br, 2H), 2.33 (br, 6H), 2.18 (br, 4H), 1.97 (m, 1H), 1.76 (m, 1H), 1.66 (s, 4H).

EXAMPLE 4A

A solution of 3-(R)-((carbobenzyloxy)amino)-γ-butyrolactone (prepared according to the procedure described in J. Am. Chem. Soc. 1986, 108, 4943-4952, 7.72 g, 32.8 mmol) in THF (100mL) was saturated with gaseous dimethylamine, stirred at room

temperature for 16 hours, and concentrated. The residue was filtered through a plug of silica gel eluting with 50% acetone in hexanes to give the desired product.

EXAMPLE 4B

A solution of EXAMPLE 4A (8.45 g, 30.14 mmol) in toluene (15 mL) was treated with tributylphosphine (9.76 mL, 39.20 mmol) and diphenyldisulfide (7.30 g, 39.20 mmol) and heated to 80 °C for 16 hours. The reaction mixture was concentrated and purified by column chromatography on silica gel eluting with a gradient of 0–50% ethyl acetate in hexanes to give the desired product.

EXAMPLE 4C

EXAMPLE 4B (7.5g) and bis(cyclopentadienyl)zirconium(IV) chloride hydride (10.31 g) in THF (100 mL) at 25°C was stirred for 20 minutes and concentrated. The concentrate was chromatographed on silica gel with with 50% ethyl acetate in hexane.

EXAMPLE 4D

EXAMPLE 4C (2.87 g) and N-isopropylmethylamine (1.92 g) in 1,2-dichloroethane (50 mL) at 25°C was treated with sodium triacetoxyborohydride (3 g), stirred for 2 hours, diluted with ethyl acetate, washed with 2M NaOH, water and brine and dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated. The concentrate was chromatographed on silica gel with with 1% methanol/dichloromethane.

EXAMPLE 4E

This example was prepared by substituting EXAMPLE 4D for EXAMPLE 1B in EXAMPLE 1C.

EXAMPLE 4F

This example was prepared by substituting EXAMPLE 4E for EXAMPLE 1D in EXAMPLE 1I.

EXAMPLE 4G

This example was prepared by substituting EXAMPLE 4F for EXAMPLE 1I in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.08 (s, 1H), 7.98 (d, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.37 (m, 4H), 7.28 (t, 2H), 7.20 (t, 1H), 7.12 (d, 2H), 6.89 (d, 1H), 6.78 (d, 2H), 6.70 (d, 1H), 4.01 (m, 1H), 3.13 (m, 6H), 2.75 (m, 2H), 2.28 (m, 6H), 2.04 (m, 4H), 1.99 (m, 2H), 1.43 (m, 2H), 1.12 (m, 10H), 0.97 (s, 6H).

EXAMPLE 5

This example was prepared by substituting 4-(4-(2-(4-chlorophenyl)cyclo-1-enylmethyl)piperazin-1-yl)benzoic acid, prepared as described in commonly-owned U.S. Patent Application Ser. No. 10/988,338, and EXAMPLE 4F for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.00 (m, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.98 (d, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.36 (m, 4H), 7.30 (t, 2H), 7.20 (t, 1H), 7.09 (d, 2H), 6.90 (d, 1H), 6.78 (d, 2H), 6.65 (d, 1H), 4.00 (m, 2H), 3.13 (m, 4H), 2.78 (m, 2H), 2.55 (m, 2H), 2.40 (m, 4H), 2.31 (m, 4H), 2.00 (m, 3H), 1.79 (m, 4H), 1.58 (m, 4H), 1.51 (m, 2H), 1.12 (m, 6H).

EXAMPLE 6A

This example was prepared by substituting EXAMPLE 4B for EXAMPLE 1B in EXAMPLE 1C.

EXAMPLE 6B

EXAMPLE 6A (6.13 g) in THF (200 mL) at 25°C was treated with di-tert-butyldicarbonate (7 g), stirred for 4 hours and concentrated. The concentrate was dissolved into ethyl acetate (500 mL), washed with 1M NaOH, water and brine and dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated. The concentrate in THF (200 mL) at 25°C to was treated with 1M NaOH (200 mL), stirred for 5 hours and isolated. The water layer was extracted with ethyl acetate, and the THF and ethyl acetate extracts were combined, washed with water and brine and dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated.

EXAMPLE 6C

This example was prepared by substituting EXAMPLE 6B for EXAMPLE 5B in EXAMPLE 4C.

EXAMPLE 6D

This example was prepared by substituting EXAMPLE 6C and 2-oxa-5-aza-bicyclo[2.2.1]heptane, prepared as described in commonly-owned U.S. Patent Application Ser. No. 10/988,338, for EXAMPLE 4C and N-isopropylmethyl amine in EXAMPLE 4D.

EXAMPLE 6E

EXAMPLE 6D (7.86 g) in dichloromethane (200 mL) at 25°C was treated with 2M HCl in diethyl ether (200 mL), stirred for 18 hours and concentrated.

EXAMPLE 6F

This example was prepared by substituting EXAMPLE 6E for EXAMPLE 1D in EXAMPLE 2F.

EXAMPLE 6G

This example was prepared by substituting EXAMPLE 6F and EXAMPLE 3C for EXAMPLE 1I and EXAMPLE 1M in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.07 (s, 1H), 7.92 (d, 1H), 7.70 (d, 2H), 7.37 (m, 4H), 7.30 (t, 2H), 7.21 (t, 1H), 7.12 (d, 2H), 6.84 (d, 1H), 6.79 (d, 2H), 4.21 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 4.01 (m, 2H), 3.82 (m, 2H), 3.46 (m, 1H), 3.18 (m, 6H), 2.86 (m, 4H), 2.75 (m, 4H), 2.28 (m, 2H), 2.18 (m, 4H), 1.88 (m, 4H), 1.66 (m, 4H).

EXAMPLE 7

This example was prepared by substituting EXAMPLE 3C for EXAMPLE 1M in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 8.09 (d, 1H), 7.92 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.31 (m 7H), 7.18 (tt, 1H), 7.12 (dt, 2H), 6.92 (d, 1H), 6.82 (m, 3H), 4.04

(m, 1H), 3.51 (m, 4H), 3.26 (m, 10H), 2.82 (m, 2H), 2.30 (m, 10H), 1.94 (m, 1H), 1.72 (m, 5H).

EXAMPLE 8A

A solution of 3-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4-phenylsulfanylbutyric acid, prepared as described in commonly-owned U.S. Patent Application Ser. No. 10/988,338 and HATU in DMF was treated with 7-aza-bicyclo[2.2.1]heptane (prepared as described in Org. Lett., 2001, 3, 1371-1374; and N-methylmorpholine, stirred at ambient temperature for 30min, diluted with ethyl acatate, washed with 1.5% HCl, $NaHCO_3$(aq), H_2O and brine, dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated to give the desired product.

EXAMPLE 8B

A solution of EXAMPLE 8A in THF was treated with diethyl amine, stirred at ambient temperature for 2 hours and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography eluting with CH_2Cl_2 (saturated with NH_3), followed by ethyl acetate to give the desired product.

EXAMPLE 8C

This example was prepared by substituting EXAMPLE 8B for EXAMPLE 1C in EXAMPLE 1D.

EXAMPLE 8D

This example was prepared by substituting EXAMPLE 8C for EXAMPLE 1D in EXAMPLE 1I.

EXAMPLE 8E

This example was prepared by substituting EXAMPLE 8D and EXAMPLE 3C for EXAMPLE 1I and EXAMPLE 1M, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 9.19 (m, 1H), 8.07 (d, 1H), 7.97 (d, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.31 (m

6H), 7.20 (tt, 1H), 7.12 (dt, 2H), 6.89 (d, 1H), 6.76 (d, 2H), 6.65 (d, 1H), 4.03 (m, 2H), 3.31 (m, 4H), 3.12 (m, 4H), 2.90 (br, 2H), 2.76 (m 2H), 1.96 (m, 21H).

EXAMPLE 9A

This example was prepared by substituting EXAMPLE 6E for EXAMPLE 1D in EXAMPLE 1I.

EXAMPLE 9B

This example was prepared by substituting EXAMPLE 9A and EXAMPLE 3C for EXAMPLE 1I and EXAMPLE 1M, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 8.08 (d, 1H), 7.94 (d, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.32 (m 7H), 7.20 (tt, 1H), 7.12 (dt, 2H), 6.87 (d, 1H), 6.78 (d, 3H), 4.40 (m, 1H), 4.03 (m, 2H), 3.83 (m, 2H), 3.54 (m, 2H), 3.26 (m, 2H), 3.14 (m, 4H), 2.80 (br, 2H), 2.78 (m, 4H), 1.97 (m, 14H).

EXAMPLE 10

This example was prepared by substituting EXAMPLE 9A for EXAMPLE 1I in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 8.09 (d, 1H), 7.95 (d, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.33 (m 7H), 7.20 (tt, 1H), 7.12 (dt, 2H), 6.90 (d, 1H), 6.79 (d, 3H), 4.44 (m, 1H), 4.03 (m, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.57 (m, 1H), 3.02 (m, 13H), 2.25 (m, 6H), 1.99 (m, 6H), 1.43 (t, 2H), 0.97 (s, 6H).

EXAMPLE 11

This example was prepared by substituting EXAMPLE 6F for EXAMPLE 1I in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 8.07 (d, 1H), 7.93 (d, 1H), 7.70 (d, 2H), 7.33 (m 7H), 7.20 (tt, 1H), 7.12 (dt, 2H), 6.81 (m, 4H), 4.41 (m, 1H), 4.06 (m, 1H), 3.83 (m, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.02 (m, 13H), 2.25 (m, 6H), 1.99 (m, 6H), 1.43 (t, 2H), 0.97 (s, 6H).

EXAMPLE 12

This example was prepared by substituting 4-(4-(2-(4-chlorophenyl)cyclohept-1-enylmethyl)piperazin-1-yl)benzoic acid, prepared as described in commonly-owned U.S. Patent Application Ser. No. 10/988,338, and EXAMPLE 9A for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 8.09 (d, 1H), 7.95 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.32 (m 7H), 7.19 (tt, 1H), 7.09 (dt, 2H), 6.90 (d, 1H), 6.79 (d, 3H), 4.45 (m, 1H), 4.03 (m, 2H), 3.85 (m, 2H), 3.55 (m, 2H), 3.04 (m, 8H), 2.34 (m, 8H), 1.85 (m, 7H), 1.54 (m, 5H).

EXAMPLE 13

This example was prepared by substituting 4-(4-(2-(4-chlorophenyl)cyclohept-1-enylmethyl)piperazin-1-yl)benzoic acid, prepared as described in commonly-owned U.S. Patent Application Ser. No. 10/988,338, and EXAMPLE 6F for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 8.07 (d, 1H), 7.93 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.32 (m 7H), 7.20 (tt, 1H), 7.09 (dt, 2H), 6.87 (d, 1H), 6.79 (d, 3H), 4.45 (m, 1H), 4.02 (m, 2H), 3.84 (m, 2H), 3.56 (m, 2H), 3.07 (m, 8H), 2.33 (m, 8H), 1.85 (m, 7H), 1.54 (m, 5H).

EXAMPLE 14

This example was prepared by substituting EXAMPLE 2K and EXAMPLE 4F for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 8.07 (d, 1H), 7.96 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.33 (m 7H), 7.20 (tt, 1H), 7.09 (dt, 2H), 6.87 (d, 1H), 6.77 (d, 2H), 6.72 (d, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.28 (m, 4H), 3.12 (m, 4H), 2.79 (m, 2H), 2.48 (m, 2H), 2.23 (m, 8H), 2.02 (m, 4H), 1.42 (t, 2H), 1.08 (m, 6H), 0.96 (s, 6H).

EXAMPLE 15A

This example was prepared by substituting EXAMPLE 6C and 1,4-oxazepane for EXAMPLE 4C and N-isopropyl-N-methylamine in EXAMPLE 4D.

EXAMPLE 15B

This example was prepared by substituting EXAMPLE 15A for EXAMPLE 6D in EXAMPLE 6E.

EXAMPLE 15C

This example was prepared by substituting EXAMPLE 15B for EXAMPLE 1D in EXAMPLE 1I.

EXAMPLE 15D

This example was prepared by substituting EXAMPLE 15C and EXAMPLE 3C for EXAMPLE 1I and EXAMPLE 1M, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 8.32 (s, 1H), 8.01 (br, 1H), 7.67 (d, 2H), 7.34 (t, 4H), 7.24 (m, 3H), 6.99 (m, 3H), 6.67 (br, 3H), 3.97 (br, 1H), 3.88 (s, 2H), 3.79 (s, 2H), 3.73-3.23 (br m, 12H), 3.14 (m, 6H), 2.29 (s, 6H), 2.08 (m, 2H), 1.74 (s, 4H).

EXAMPLE 16A

This example was prepared by substituting azepane for N-isopropyl-N-methylamine in EXAMPLE 4D.

EXAMPLE 16B

This example was prepared by substituting EXAMPLE 16A for EXAMPLE 4D in EXAMPLE 4E.

EXAMPLE 16C

This example was prepared by substituting EXAMPLE 16A for EXAMPLE 1D in EXAMPLE 1I.

EXAMPLE 16D

This example was prepared by substituting EXAMPLE 16C and EXAMPLE 3C for EXAMPLE 1I and EXAMPLE 1M, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 8.33 (s, 1H), 8.01 (d, 1H), 7.67 (d, 2H), 7.34 (t, 4H), 7.23 (m, 3H),

6.98 (m, 3H), 6.67 (m, 3H), 3.99 (m, 1H), 3.82-3.19 (br m, 10H), 3.12 (s, 4H), 2.86 (m, 2H), 2.55 (br, 2H), 2.29 (s, 4H), 2.06 (m, 1H), 1.93 (m, 3H), 1.74 (s, 8H), 1.60 (m, 2H).

EXAMPLE 17A

This example was prepared by substituting EXAMPLE 6A for EXAMPLE 1C in EXAMPLE 1D.

EXAMPLE 17B

This example was prepared by substituting EXAMPLE 17B for EXAMPLE 1D in EXAMPLE 1I.

EXAMPLE 17C

This example was prepared by substituting 4-(4-(2-(4-chlorophenyl)cyclohept-1-enylmethyl)piperazin-1-yl)benzoic acid, prepared as described in commonly-owned U.S. Patent Application Ser. No. 10/988,338, and EXAMPLE 17B for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 9.58 (brs, 1H), 9.46 (brs, 1H), 8.18 (d, 1H), 8.00 (dd, 1H), 7.77 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.29 (d, 2H), 7.24 (m, 2H), 7.13 (m, 4H), 6.96 (m, 3H), 4.12 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.38 (m, 4H), 3.15 (m, 4H), 3.02 (m, 2H), 2.74 (s, 6H), 2.46 (m, 4H), 2.09 (m, 2H), 1.81 (m, 2H), 1.57 (m, 4H).

EXAMPLE 18A

This example was prepared by substituting EXAMPLE 2E and EXAMPLE 17B for EXAMPLE 1H and EXAMPLE 1D in EXAMPLE 1I.

EXAMPLE 18B

This example was prepared by substituting EXAMPLE 18A and EXAMPLE 3C for EXAMPLE 1I and EXAMPLE 1M, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 9.60 (brs, 1H), 9.47 (brs, 1H), 8.18 (d, 1H), 7.99 (dd, 1H), 7.77

(d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.30 (d, 2H), 7.24 (m, 2H), 7.15 (m, 3H), 7.12 (d, 1H), 6.96 (m, 3H), 6.92 (d, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.91 (m, 2H), 3.60 (m, 2H), 3.37 (m, 4H), 3.15 (m, 2H), 3.02 (m, 1H), 2.74 (s, 6H), 2.25 (d, 4H), 2.08 (m, 2H), 1.71 (m, 4H).

EXAMPLE 19

This example was prepared by substituting EXAMPLE 2F for EXAMPLE 1I in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 8.11 (d, 1H), 7.93 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.36 (m, 4H), 7.27 (m, 2H), 7.18 (m, 1H), 7.12 (d, 2H), 6.97 (d, 1H), 6.85 (m, 3H), 4.05 (m, 1H), 3.53 (m, 4H), 3.23 (m, 1H), 2.83 (m, 1H), 2.34 (m, 8H), 2.22 (m, 2H), 1.99 (m, 2H), 1.96 (m, 1H), 1.77 (m, 1H), 1.44 (t, 2H), 0.97 (s, 6H).

EXAMPLE 20

This example was prepared by substituting EXAMPLE 17B for EXAMPLE 1I in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.46 (brs, 1H), 8.18 (d, 1H), 7.99 (dd, 1H), 7.76 (d, 2H), 7.40 (d, 2H), 7.29 (d, 2H), 7.23 (t, 2H), 7.14 (s, 4H), 6.95 (m, 3H), 4.11 (m, 1H), 3.88 (m, 2H), 3.58 (m, 4H), 3.08 (m, 4H), 2.73 (s, 6H), 2.27 (m, 2H), 2.08 (m, 2H), 2.02 (s, 2H), 1.47 (t, 2H), 1.00 (s, 6H).

EXAMPLE 21

This example was prepared by substituting 4-(4-(4-(4-chlorophenyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-3-ylmethyl)piperazin-1-yl)benzoic acid, prepared as described in commonly-owned U.S. Patent Application Ser. No. 10/988,338, for EXAMPLE 1M in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.27 (d, 1H), 8.11 (d, 1H), 7.89 (d, 2H), 7.59 (d, 2H), 7.48 (m, 4H), 7.37 (m, 3H), 7.13 (m, 1H), 7.01 (m, 3H), 4.35 (s, 2H), 4.24 (m, 1H), 3.97 (m, 2H), 3.68 (m, 4H), 3.36 (m, 6H), 3.07 (m, 3H), 2.68 (s, 2H), 2.59 (m, 4H), 2.14 (m, 2H), 1.93 (m, 2H).

EXAMPLE 22A

This example was prepared by substituting EXAMPLE 4E for EXAMPLE 2E in EXAMPLE 2F.

EXAMPLE 22

This example was prepared by substituting EXAMPLE 2K and EXAMPLE 22A for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.21 (brs, 1H), 8.17 (m, 1H), 8.00 (dd, 1H), 7.77 (d, 2H), 7.42 (m, 2H), 7.31 (m, 2H), 7.24 (m, 2H), 7.14 (m, 4H), 6.97 (m, 3H), 4.11 (m, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.12 (m, 6H), 2.84 (m, 3H), 2.63 (m, 3H), 2.25 (m, 2H), 2.07 (m, 4H), 1.49 (t, 2H), 1.16 (m, 6H), 0.97 (s, 6H).

EXAMPLE 23

This example was prepared by substituting EXAMPLE 22A for EXAMPLE 1I in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.21 (brs, 1H), 8.18 (m, 1H), 7.99 (dd, 1H), 7.78 (d, 2H), 7.40 (d, 2H), 7.30 (d, 2H), 7.24 (m, 2H), 7.15 (m, 4H), 6.97 (m, 3H), 4.11 (m, 1H), 3.89 (m, 1H), 3.13 (m, 6H), 2.84 (m, 2H), 2.63 (m, 3H), 2.28 (m, 2H), 2.07 (m, 4H), 1.48 (t, 2H), 1.17 (m, 6H), 1.00 (s, 6H).

EXAMPLE 24

This example was prepared by substituting EXAMPLE 2K for EXAMPLE 1M in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 12.14 (brs, 1 H), 9.89 (brs, 1H), 9.52 (s, 1H), 8.18 (d, 1H), 8.00 (dd, 1H), 7.77 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.30 (d, 2H), 7.24 (t, 2H), 7.14 (m, 4H), 6.96 (m, 3H), 4.12 (m, 1H), 3.93 (m, 3H), 3.63 (m, 4H), 2.93 (m, 10H), 2.24 (m, 2H), 2.09 (m, 4H), 1.48 (t, 2H), 0.97 (s, 6H).

EXAMPLE 25

This example was prepared by substituting EXAMPLE 2K and EXAMPLE 6F for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.58 (brs, 1H), 9.39 (brs, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.99 (dd, 1H), 7.77 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.30 (d, 2H), 7.24 (t, 2H), 7.14 (m, 4H), 6.97 (m, 3H), 4.63 (d, 1H), 4.43 (d, 1H), 4.13 (m, 1H), 3.92 (m, 2H), 3.69 (m, 2H), 3.52 (m, 2H), 3.01 (m, 6H), 2.25 (m, 2H), 2.04 (m, 6H), 1.49 (m, 2H), 0.98 (s, 6H).

EXAMPLE 26

This example was prepared by substituting EXAMPLE 17B and EXAMPLE 3C for EXAMPLE 1I and EXAMPLE 1M, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.49 (brs, 1H), 8.08 (d, 1H), 7.95 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.36 (m, 4H), 7.30 (t, 2H), 7.20 (t, 1H), 7.12 (d, 2H), 6.84 (m, 2H), 6.78 (d, 2H), 3.98 (m, 1H), 3.28 (m, 2H), 3.12 (brs, 4H), 2.81 (brs, 1H), 2.77 (s, 1H), 2.46 (s, 6H), 2.28 (s, 4H), 2.19 (m, 4H), 2.00 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.65 (m, 4H).

EXAMPLE 27A

This example was prepared by substituting pyrrolidine for N-isopropylethylamine in EXAMPLE 4D.

EXAMPLE 27B

This example was prepared by substituting EXAMPLE 27A for EXAMPLE 4D in EXAMPLE 4E.

EXAMPLE 27C

This example was prepared by substituting EXAMPLE 27B for EXAMPLE 1D in EXAMPLE 1I.

EXAMPLE 27D

This example was prepared by substituting EXAMPLE 27C and EXAMPLE 3C for EXAMPLE 1I and EXAMPLE 1M, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.08 (d, 1H), 7.96 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.36 (m, 4H), 7.30 (t, 2H), 7.20 (t, 1H), 7.12 (d, 2H), 6.87 (m, 1H), 6.77 (d, 2H), 6.72 (d, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.26 (m, 2H), 3.12 (brs, 4H), 2.97 (m, 6H), 2.76 (s, 1H), 2.28 (brs, 4H), 2.19, (m, 4H), 2.05 (m, 1H), 1.95 (m, 1H), 1.82 (brs, 4H), 1.65 (m, 4H).

EXAMPLE 28

This example was prepared by substituting EXAMPLE 2K and EXAMPLE 17B for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.59 (brs, 1H), 8.08 (d, 1H), 7.94 (dd, 1H), 7.70 (d, 2H), 7.36 (m, 4H), 7.30 (t, 2H), 7.21 (tt, 1H), 7.09 (d, 2H), 6.83 (d, 1H), 6.78 (d, 3H), 3.97 (m, 1H), 3.28 (m, 2H), 3.13 (brs, 4H), 2.90 (brs, 2H), 2.79 (s, 2H), 2.55 (s, 6H), 2.28 (brs, 4H), 2.20 (m, 2H), 1.99 (s, 2H), 1.90 (m, 2H), 1.42 (t, 2H), 0.96 (s, 6H).

EXAMPLE 29

This example was prepared by substituting 4-(4-(2-(4-chlorophenyl)cyclo-1-enylmethyl)piperazin-1-yl)benzoic acid, prepared as described in commonly-owned U.S. Patent Application Ser. No. 10/988,338, and EXAMPLE 27C for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.60 (brs, 1H), 8.08 (d, 1H), 7.94 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.36 (m, 4H), 7.30 (t, 2H), 7.20 (t, 1H), 7.09 (d, 2H), 6.83 (d, 1H), 6.77 (d, 3H), 3.99 (m, 1H), 3.26 (m, 2H), 3.12 (brs, 4H), 2.80 (m, 5H), 2.76 (s, 2H), 2.40 (m, 4H), 2.31 (brs, 4H), 1.99 (m, 1H), 1.89 (m, 1H), 1.77 (brs, 6H), 1.58 (m, 2H), 1.51 (m, 2H).

EXAMPLE 30A

This example was prepared by substituting EXAMPLE 2E and EXAMPLE 27B for EXAMPLE 1H and EXAMPLE 1D in EXAMPLE 1I.

EXAMPLE 30B

This example was prepared by substituting EXAMPLE 30A for EXAMPLE 1I and EXAMPLE 1D in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.57 (brs, 1H), 8.07 (d, 1H), 7.93 (dd, 1H), 7.70 (d, 2H), 7.36 (m, 4H), 7.30 (t, 2H), 7.21 (t, 1H), 7.12 (d, 2H), 6.81 (d, 1H), 6.77 (d, 3H), 3.99 (m, 1H), 3.26 (m, 2H), 3.12 (brs, 4H), 2.80 (m, 5H), 2.76 (s, 2H), 2.27 (m, 4H), 2.22 (m, 2H), 1.99 (m, 3H), 1.88 (m, 1H), 1.77 (brs, 4H), 1.43 (t, 2H), 0.97 (s, 6H).

EXAMPLE 31

This example was prepared by substituting EXAMPLE 2K and EXAMPLE 30A for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.52 (brs, 1H), 8.06 (d, 1H), 7.92 (dd, 1H), 7.70 (d, 2H), 7.36 (m, 4H), 7.30 (t, 2H), 7.21 (t, 1H), 7.08 (d, 2H), 6.81 (d, 1H), 6.77 (d, 3H), 3.99 (m, 1H), 3.26 (m, 2H), 3.12 (brs, 4H), 2.76 (s, 2H), 2.75 (m, 5H), 2.26 (m, 4H), 2.20 (m, 2H), 1.99 (m, 3H), 1.86 (m, 1H), 1.76 (brs, 4H), 1.42 (t, 2H), 0.96 (s, 6H).

EXAMPLE 32

This example was prepared by substituting 4-(4-(2-(4-chlorophenyl)cyclohept-1-enylmethyl)piperazin-1-yl)benzoic acid, prepared as described in commonly-owned U.S. Patent Application Ser. No. 10/988,338, and EXAMPLE 30A for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.50 (brs, 1H), 8.08 (d, 1H), 7.94 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.36 (m, 4H), 7.30 (t, 2H), 7.20 (t, 1H), 7.09 (d, 2H), 6.83 (d, 1H), 6.77 (d, 3H), 3.99 (m, 1H), 3.26 (m, 2H), 3.12 (brs, 4H), 2.80 (m, 5H), 2.76 (s, 2H), 2.40 (m, 4H), 2.31 (brs, 4H), 1.98 (m, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.76 (brs, 6H), 1.58 (m, 2H), 1.51 (m, 2H).

EXAMPLE 33

This example was prepared by substituting EXAMPLE 4F and EXAMPLE 3C for EXAMPLE 1I and EXAMPLE 1M, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 9.03 (s, 1H), 8.08 (d, 1H), 7.97 (d, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.39-7.34 (m, 4H), 7.30 (t, 2H), 7.20 (tt, 1H), 7.13 (dt, 2H), 6.88 (m, 1H), 6.78 (d, 2H), 6.70 (m, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.37-3.26 (m, 4H), 3.12 (s, 4H), 2.76 (s, 2H), 2.68-2.53 (m, 2H), 2.34-2.13 (m, 10H), 2.10-1.95 (m, 2H), 1.66 (s, 4H), 1.13 (m, 6H).

EXAMPLE 34

This example was prepared by substituting EXAMPLE 2K and EXAMPLE 27C for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6) δ 9.53 (s, 1H), 8.08 (d, 1H), 7.97 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.40-7.34

(m, 4H), 7.30 (t, 2H), 7.20 (tt, 1H), 7.09 (d, 2H), 6.89 (d, 1H), 6.78 (d, 2H), 6.71 (d, 1H), 4.01 (m, 1H), 3.38-3.27 (m, 4H), 3.20-2.84 (m, 10H), 2.79 (s, 2H), 2.27 (s, 4H), 2.20 (t, 2H), 2.03 (m, 2H), 1.85 (m, 4H), 1.42 (t, 2H), 0.96 (s, 6H).

EXAMPLE 35

This example was prepared by substituting EXAMPLE 3C and EXAMPLE 30A for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 8.06 (d, 1H), 7.93 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.36 (m, 4H), 7.30 (m, 2H), 7.21 (m, 1H), 7.12 (d, 2H), 6.81 (d, 1H), 6.77 (d, 3H), 3.97 (m, 1H), 3.26 (m, 4H), 3.12 (s, 4H), 2.78 (m, 6H), 2.27 (s, 4H), 2.18 (m, 4H), 1.99 (m, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.76 (s, 4H), 1.66 (s, 4H).

EXAMPLE 36

This example was prepared by substituting EXAMPLE 2K and EXAMPLE 9A for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.09 (d, 1H), 7.97 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.33 (m, 6H), 7.21 (m, 1H), 7.08 (d, 2H), 6.87 (m, 1H), 6.78 (m, 3H), 3.99 (m, 1H), 3.14 (m, 4H), 2.95 (m, 1H), 2.80 (m, 3H), 2.58 (s, 6H), 2.28 (m, 4H), 2.20 (m, 2H), 1.99 (m, 4H), 1.42 (t, 2H), 0.96 (s, 6H).

EXAMPLE 37

This example was prepared by substituting EXAMPLE 2K and EXAMPLE 17B for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.09 (d, 1H), 7.97 (dd, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.33 (m, 6H), 7.21 (m, 1H), 7.08 (d, 2H), 6.87 (m, 1H), 6.78 (m, 3H), 3.99 (m, 1H), 3.14 (m, 4H), 2.95 (m, 1H), 2.80 (m, 3H), 2.58 (s, 6H), 2.28 (m, 4H), 2.20 (m, 2H), 1.99 (m, 4H), 1.42 (t, 2H), 0.96 (s, 6H).

EXAMPLE 38

This example was prepared by substituting 4-(4-(1,1'-biphenyl-2-ylmethyl)-1-piperazinyl)benzoic acid, prepared as described in commonly-owned U.S. Patent Application Ser. No. 10/988,338, for EXAMPLE 1M and EXAMPLE 17B for EXAMPLE 1I, respectively, in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 8.19 (d, 1H), 7.99 (dd, 1H), 7.76 (d, 3H), 7.52 (d, 4H), 7.40 (d, 2H), 7.35 (m, 1H), 7.30 (d, 2H), 7.24 (t, 2H), 7.16 (t, 2H), 6.96 (m, 3H), 4.25 (br, 2H), 4.12 (m, 1H), 3.37 (m, 2H), 3.14 (m, 1H), 3.10 (br, 8H), 2.74 (s, 6H), 2.10 (m, 2H).

EXAMPLE 39

This example was prepared by substituting 4-(4-(1,1'-biphenyl-2-ylmethyl)-1-piperazinyl)benzoic acid, prepared as described in commonly-owned U.S. Patent Application Ser. No. 10/988,338, for EXAMPLE 1M in EXAMPLE 1N. ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 8.19 (d, 1H), 8.00 (dd, 1H), 7.76(d, 2H), 7.52 (m, 5H), 7.14 (m, 8H), 6.96 (m, 3H), 4.29 (m, 2H), 4.14 (m, 2H), 4.02 (m, 1H), 3.10 (m, 8H), 2.13 (m, 2H).

EXAMPLE 40

Antibodies

All antibodies were purchased from commercial sources as follows: antibodies against INCENP, histone H3, histone H3-(pSer^{10}), BIK, PUMA, and BAK were from Cell Signaling Technology; antibodies against Aurora B, Bad, and Ral-A were from Epitomics; antibodies against Aurora A, p53, cytochrome C, Bid, and Bim were from BD Biosciences; antibodies against Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, and S6K1 were from Santa Cruz Biotechnology; antibodies against BAX were from Abcam; antibodies against NOXA were from Imgenex; antibodies against the active BAX conformer (6A7) were from

Sigma; antibodies against the active BAK conformer (Ab2) were from Calbiochem; antibodies against β-actin were from R&D systems.

Small-molecules and siRNAs

Active components of the clinical drugs BCNU, Doxorubicin, Gemcitabine, Etoposide, 5-FU, ALIMTA, Rapamycin, and the previously disclosed Abbott compounds, ABT-751 (β-tubulin inhibitor), ABT-888 (PARP inhibitor) (See, Donawho, C.K. et al., "ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models," *Clin Cancer Res* 13, 2728-37 (2007)), ABT-263 (Bcl-2 protein family inhibitor) (See, Tse, C. et al., "ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor," *Cancer Res* 68, 3421-8 (2008)), Ritonavir (See, Kempf, D.J. et al., "Discovery of ritonavir, a potent inhibitor of HIV protease with high oral bioavailability and clinical efficacy," *J Med Chem* 41, 602-17 (1998)), A-443654 (AKT inhibitor) (See, Luo, Y. et al., "Potent and selective inhibitors of Akt kinases slow the progress of tumors in vivo," *Mol Cancer Ther* 4, 977-86 (2005)), and A-407846 (histone deacetylase) (See, Vasudevan, A. et al., "Heterocyclic ketones as inhibitors of histone deacetylase," *Bioorg Med Chem Lett* 13, 3909-13 (2003)) were obtained from the Compound Depository of Abbott Laboratories, the assignee of the present application. 17-AAG was purchased from AG Scientific (San Diego, CA). The chemical structures of MLN8054 (See, Manfredi, M.G. et al., "Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase," *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 4106-11 (2007)), AZD1152 (See, Mortlock, A.A. et al., "Discovery, synthesis, and in vivo activity of a new class of pyrazoloquinazolines as selective inhibitors of aurora B kinase," *J Med Chem* 50, 2213-24 (2007)), and VX-680/MK-0457 (See, Harrington, E.A. et al., "VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora Kinases, suppresses tumor growth in vivo," *Nat Med* 10, 262-7 (2004)) and BI 2536 have been disclosed. These compounds were synthesized at Abbott Laboratories for comparative purposes. AZD1152-hydroxyquinazoline pyrazol anilide (HQPA) is rapidly converted from the dihydrogen phosphate prodrug, AZD1152, in the presence of plasma (See, Mortlock, A.A. et al., "Discovery, synthesis, and in vivo activity of a new class of pyrazoloquinazolines as selective inhibitors of aurora B

kinase," *J Med Chem* 50, 2213-24 (2007)). For all studies, AZD1152-HQPA was used and referred to as AZD1152.

siRNAs against Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Aurora A, Aurora B, INCENP, BIK, NOXA, BAX, BAK, PUMA, BAD, and BIM were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO). For each target, a set of 4 ON-TARGET Plus siRNAs were prescreened for target knockdown and off-target cytotoxicity. siRNAs that triggered more than a 70% reduction of target protein without causing more than a 10% off-target growth inhibition in a 72-hour proliferation assay were selected for all siRNA-related studies. The most potent siRNA against each target was used in experiments where only one siRNA/target was used. The control, nontargeting siRNA and a previously described luciferase siRNA (See, Lin, X. et al., "'Seed' analysis of off-target siRNAs reveals an essential role of Mcl-1 in resistance to the small-molecule Bcl-2/ Bcl-X_L inhibitor ABT-737," *Oncogene* 26, 3972-9 (2007)) were also purchased from Dharmacon.

Cell Culture and Animal Studies

The human cancer cell lines SW620, D54MG, A549, PC3, EJ1, DLD1, HCT116, and 786-O were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). All cell lines were cultured according to the supplier's recommendations.

C.B.-17 *scid*-bg (*scid*-bg) or C.B.-17 *scid* (*scid*) mice were obtained from Charles River Laboratories at 5-6 weeks of age and used for studies when greater than 8 weeks of age and/or ~20 g in size. All animal studies were conducted in a specific pathogen-free environment in accordance with the Internal Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), accredited by the American Association of Laboratory Animal Care under conditions that meet or exceed the standards set by the United States Department of Agriculture Animal Welfare Act, Public Health Service policy on humane care and use of animals, and the NIH guide on laboratory animal welfare. Overt signs of dehydration, lack of grooming, lethargy, >15% weight loss as well as tumor volume >20% of body weight were used to determine tumor endpoint.

The tumor cell line HCT116 was routinely tested for *Mycoplasma* and confirmed to be microbe-free by infectious microbe PCR amplification test (IMPACT, Missouri

Research Animal Diagnostic Laboratory) prior to *in vivo* inoculation. Cells were grown in RPMI supplemented with 1 mM L-glutamine and 10% fetal bovine serum, maintained at 37°C in a humidified atmosphere equilibrated with 5% CO_2, 95% air and used between passages 3-7 when in log phase for tumor cell inoculation. Cells (1×10^6) were mixed 1:1 with matrigel (BD Biosciences) and injected *s.c.* (0.2 mL) into the shaved flank of female mice. Tumors were size-matched (482-606 mm^3) and allocated into treatment groups before dosing was initiated. Two bisecting diameters were measured with calipers and tumor volumes were estimated from the formula: (length x $width^2$)/2. VX-680 was administered intraperitoneally (I.P., 50 mg/kg/d, *b.i.d.* to end; 17 days depending on when the endpoint was reached and the study was terminated) in a vehicle containing 10% Solutol (BASF, Florham Park, NJ) and 90% tartaric acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). AZD1152 was administered I.P. (100 mg/kg/d, *b.i.d.*x3) in a vehicle containing 2% ethanol, 5% Tween-80, 20% PEG-400, 73% HPMC (Sigma-Aldrich). ABT-263 was administered PO, 75 or 100 mg/kg/d, q.d. x 13-17d in a vehicle containing 60% Phosal 50, 30% PEG 400, 10% ethanol. Agents were initially dosed concurrently in combination therapies for the duration indicated.

siRNA Transfections

Typically, cells were seeded at 5,000/well in 96-well plates in antibiotic-free growth medium and cultured overnight. The following day, cells were transfected with siRNA oligos using Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen) or DharmaFECT transfection reagent according to the manufacturer's recommendations. Individual siRNAs were transfected at a final concentration of 10 nM. For immunoblotting experiments, cells were cultured for a further 3 days, then lysates were prepared. For, siRNA/drug combinations, cells were treated with compound 24 hour post-transfection, then cultured for a further 72 hours. For long-term polyploidization, cells were cultured for up to 10 days post-transfection.

Cell Viability Assay and Caspase 3/7 Assay

Cell viability was determined using the CellTiter-GLO luminescence assay (Promega) according to manufacturer's suggested protocol. Generally, cells were seeded

at >90% viability (as determined by trypan blue exclusion) into 96-well plates overnight, treated with compounds or siRNAs for indicated duration, and the overall cell viability was determined by measuring luminescence.

Caspase-3 activity was determined using the Caspase-GLO 3/7 Assay (Promega) in tandem with the CellTiter-GLO viability assay (Promega). Parallel experiments were performed, where in one experiment Caspase-3/7 activity was measured and in the other, cell viability was determined. As Caspase-3/7 activity on a per cell basis reflects both the specific activity of the Caspase-3 enzyme and the number of viable cells, the data are expressed as Caspase-3/7 activity divided by cell viability.

Immunoblotting and Immunoprecipitation

Cell lysates were either prepared using a CHAPS lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% CHAPS) or a cell extraction buffer containing 1% Triton X-100, 0.1% SDS, and 0.5% deoxycholate (Invitrogen). All buffers were supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma) prior to use. For immunoblotting, lysates were mixed with 3x loading buffer (Cell Signaling Technology) and equal amounts of protein were separated by electrophoresis on Bis/Tris gels (Invitrogen). For immunoprecipitation, lysates were prepared in CHAPS lysis buffer and >4 mg of cell lysate was mixed with at least 8 μg of immunoprecipitating antibody overnight at 4^{O}C. The following day, 30 μl of a Protein A- or Protein G-agarose slurry was added for an additional 2 hr. Immunoprecipitates were washed three times in CHAPS lysis buffer, and heated in 1.5x loading buffer at 95°C for 5 minutes.

Purification of Cytosol

Approximately $20x10^6$ cells were rinsed once in ice-cold PBS, trypsinized, and centrifuged for 2 minutes at 1,300 rpm at 25°C. Cell pellets were rinsed once with PBS and transferred to microcentrifuge tubes. The pellet was allowed to swell in 200 μl homogenization buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 250 mM D-mannitol, 1 mM EGTA, 10 mM KCl, and 5 mM $MgCl_2$ with phosphatase and protease inhibitors) for 30 min, then dounce homogenized with 50 strokes using a type-B pestle. Cell homogenates were centrifuged twice at 1,000 x *g* for 5 minutes at 4°C to pellet nuclei and cell debris. The

supernatant was centrifuged at 10,000 x *g* for 10 minutes at 4°C. The pellet from this spin was designated "mitochondria" and further extracted in 80 µl of CHAPS lysis buffer. Extraction of mitochondria was performed on ice by repeatedly vortexing the samples for 1 minute each for ~20 minutes. The final extract was clarified by centrifugation at 14,000 x *g* for 10 minutes at 4°C to remove any contaminating cell debris. The 10,000 x *g* supernatant containing cytosol and low density membranes was centrifuged again at 100,000 x *g* (55,000 rpm in a TLA 120.2 rotor) for 1 hour to pellet membranes. The supernatant was designated "cytosol" and boiled directly in sample buffer.

Determination of Drug-Drug Interactions

Synergistic activities of VX-680 and chemotherapeutic agents were determined using the Bliss additivism model (See, Berenbaum, M.C., "Criteria for analyzing interactions between biologically active agents," *Adv Cancer Res* 35, 269-335 (1981)) where the combined response C of both agents with individual effects A and B is C = A + B – (A•B) where A and B represent the fractional inhibition between 0 and 1. Combined response scores greater than 15 were considered synergistic.

Gene Expression Analysis by Microarray

Frozen cell pellets were lysed and total RNA was isolated using the QIAshredder and RNeasy columns (Qiagen). Labeled cRNA was prepared according to the microarray manufacturer's protocol and hybridized to human genome U133A 2.0 arrays (Affymetrix). The microarray data files were loaded into Rosetta Resolver software for analysis, and the intensity values for all probe sets were normalized using the Resolver's Experimental Definition. Clustering analysis within Resolver used the Agglomerative algorithm and Pearson correlation for the similarity measure, using genes that had a 1.5-fold change or higher in 1 treatment condition. Only differences with a p-value less than 0.001 are shown. For the pathway analysis, a 1.5-fold cut-off was applied and a 5% false discovery rate was used for p-value cut-off (See, Benjamini, Y. & Hochberg, Y., "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing," *J R Statist Soc B* 57, 289-300 (1995)).

Mass Spectrometric Analysis of Immunoprecipitated Proteins

Endogenous Bcl-X_L and Mcl-1 were immunoprecipitated from HCT116 cells. Samples to be processed for mass spectrometry were loaded into every other well of a 10-well x 1 mm 4-12% Bis/Tris gel (Invitrogen) to reduce lateral contamination. The gels were run at a constant 200 V in MOPS running buffer for 45-60 minutes, then fixed in a solution of 50% methanol, 7% acetic acid for 15 minutes. After rinsing in water, the gels were treated with Sypro Ruby protein gel stain (Invitrogen) for 3 hr at room temperature. Once completed, the gels were destained in a solution of 10% methanol, 7% acetic acid for 10 minutes followed by washing and incubation in water for 30 minutes Protein bands were subsequently imaged on a Fuji imager using the green channel.

Each lane on the gel was manually cut into 24 equally-sized pieces, placed into a 96-well plate and minced. The minced gel pieces were subjected to in-gel tryptic digestion at 37°C for 5 hr using a Perkin-Elmer MassPrep unit and sequencing grade modified trypsin (6 ng/μL). The extracted peptides for each sample were lyophilized prior to resuspension in 10 μL of a solution of 5% acetonitrile, 0.1% formic acid. 9.5 μL of the resuspended samples were injected onto a 15 cm analytical capillary column (I.D. 75 μm, 5μ particle size, 200 Å pore size) packed with Michrom C18AQ magic reversed-phase resin. The peptides were eluted using an Eiksigent nano-LC unit in a 35 minute linear gradient (15 to 35 % acetonitrile in 0.1% formic acid). Hydrophobic peptides were subsequently removed by increasing the acetonitrile composition from 35% to 80% over the next 5 minutes. The eluent was directed into the orifice of a linear trap quadrupole (LTQ) mass spectrometer (ThermoFisher, Waltham, MA). Scans were collected in data-dependent double-play mode for the duration of the chromatographic separation.

Each LC-MS/MS data file was searched using Mascot Daemon v.2.2 against the NCBI non-redundant database restricted to the mammalian taxonomy. Peptides of 2^+ to 3^+ charge state were searched, with a maximum of 2 missed trypsin cleavages, carboxyamidomethyl as a fixed modification, oxidized methionine as a variable modification and a mass window of + 1.2 Da for intact peptides and + 0.8 Da for ions generated from tandem mass spectrometry. The Mascot search results for each data file were compiled by gel lane in Scaffold v.1.0 using the MudPIT compilation feature to yield protein identifications by treatment.

An interactome map of the Bcl-2 network was constructed manually using Ingenuity Pathway Analysis software (Ingenuity Systems Redwood City, CA). The composite of all protein identifications returned from Bcl-X_L immunoprecipitates under all treatment conditions was applied to the Bcl-2 network map. Mcl-1 immunoprecipitates were analyzed similarly.

Results

VX-680/MK-0547 and ABT-263 elicit synergistic cytotoxicity

Small-molecule inhibitors that specifically target the Aurora family of serine/threonine kinases are under clinical evaluation as monotherapy and will no doubt be combined with other chemotherapeutic agents. To experimentally identify agents that could be therapeutically combined with Aurora Kinase inhibitors, VX-680, a pan-Aurora inhibitor, was screened in combination with 19 clinical and experimental cancer therapeutics for their effect on cell viability. A unique synergistic activity was observed when VX-680 was combined with ABT-263 (FIG. 8A), an orally bioavailable, small-molecule BH3 mimetic that inhibits Bcl-X_L, Bcl-2, and Bcl-w (FIG. 8A). Bliss analysis showed that VX-680 was synergistic with ABT-263 in tumor cell lines irrespective of histological type (*e.g.*, D54MG (glioma), NCI-H460 and A549 (lung carcinoma), PC3 (prostate carcinoma), EJ1 (bladder carcinoma), HCT116, DLD1, and SW620 (colon carcinoma), and 786-O (renal carcinoma); FIG. 8A-B and data not shown), indicating that the synergy observed for these two classes of oncology drugs may reflect a molecular susceptibility pervasive in cancer cells. The targets/mechanisms of action of each of the 19 clinical and experimental cancer therapeutics and the corresponding dose responses for the combination screen is summarized in Table A, below.

TABLE A

		6-point dose response (μM)					
Compound	**Target/MOA**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
ABT-263	Bcl-XL/-2	0	0.062	0.19	0.56	1.7	5.0
ABT-751	β-tubulin	0	0.062	0.19	0.56	1.7	5.0
ABT-888	PARP	0	0.062	0.19	0.56	1.7	5.0
ABT-100	farnesyltransferase	0	0.062	0.19	0.56	1.7	5.0
Ritonavir	CYP3A4	0	0.062	0.19	0.56	1.7	5.0
A-443654	Akt	0	0.012	0.037	0.11	0.33	1.0

A-407876	histone deacetylase	0	0.012	0.037	0.11	0.33	1.0
BI 2536	Plk1	0	0.062	0.19	0.56	1.7	5.0
Rapamycin	mTORC1	0	0.062	0.19	0.56	1.7	5.0
Etoposide	topoisomerase II	0	0.062	0.19	0.56	1.7	5.0
Alimta	thymidylate synthase	0	0.012	0.037	0.11	0.33	1.0
17-AAG	Hsp90	0	0.012	0.037	0.11	0.33	1.0
Doxorubicin	DNA alkylator	0	0.012	0.037	0.11	0.33	1.0
Velcade	proteasome	0	0.0062	0.019	0.056	0.17	0.50
Gemcitabine	nucleoside analog	0	0.0025	0.0074	0.022	0.067	0.20
Gleevec	Abl	0	0.37	1.1	3.3	10	30
BCNU	DNA alkylator	0	0.37	1.1	3.3	10	30
Fluorouracil	thymidylate synthase	0	0.12	0.37	1.1	3.3	10
Vincristine	tubulin	0	0.00062	0.0019	0.0056	0.017	0.050

The synergistic activity of VX-680 and ABT-263 can be fully ascribed to the combined inhibition of Aurora B and Bcl-X_L

VX-680 is a potent inhibitor of Aurora A, B, and C kinases with $K_{i(app)}$ values of 0.6, 18, and 4.6 nM, respectively . Inhibition of Aurora A results primarily in mitotic delay or arrest (See, Manfredi, M.G. et al., "Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase," *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 4106-11 (2007)); whereas inhibition of Aurora B produces gross polyploidization (See, Wilkinson, R.W. et al., "AZD1152, a selective inhibitor of Aurora B kinase, inhibits human tumor xenograft growth by inducing apoptosis," *Clin Cancer Res.* 13, 3682-8 (2007)). It was, therefore, important to distill from the pan-Aurora profile of VX-680 the Aurora Kinase activity that would suffice for synergy with ABT-263. Likewise, ABT-263 inhibits Bcl-X_L, Bcl-2, and Bcl-w with similar potencies, displaying K_i values of $\leq$0.5, $\leq$1, and $\leq$1 nM, respectively, and presents a similar complication. Therefore, these activities were deconvoluted to identify the activities that were sufficient for synergy using both siRNA and selective small-molecules. When added in combination with ABT-263, Aurora B, but not Aurora A, siRNA was synergistically antiproliferative in combination with ABT-263, though both siRNAs efficiently knocked down their respective targets (FIG. 9A and 9B). MLN8054, a small-molecule inhibitor of Aurora A, showed no synergy in combination with ABT-263 (FIG. 9C) at Aurora A-selective concentrations (<5 μM) (See, Manfredi, M.G. et al., "Antitumor activity of MLN8054, an orally active small molecule inhibitor of Aurora A kinase," *Proc Natl Acad Sci USA* 104,

4106-11 (2007) and Li, J. et al., "Inhibition of Aurora B kinase sensitizes a subset of human glioma cells to TRAIL concomitant with induction of TRAIL-R2," *Cell Death Differ*, Epub ahead of print (2008)). In contrast, synergy was observed when ABT-263 was combined with the Aurora B-selective inhibitor, AZD1152 (See, Wilkinson, R.W. et al., "AZD1152, a selective inhibitor of Aurora B kinase, inhibits human tumor xenograft growth by inducing apoptosis," *Clin Cancer Res.* 13, 3682-8. (2007) and Mortlock, A.A. et al., "Discovery, synthesis, and in vivo activity of a new class of pyrazoloquinazolines as selective inhibitors of aurora B kinase," *J Med Chem* 50, 2213-24 (2007)) (FIG.9D).

While ABT-263 inhibits Bcl-2, Bcl-X_L, and Bcl-w, it is relatively inactive vs. other anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, such as Mcl-1 and Bcl-A1 . Because Bcl-2 and Bcl-X_L are commonly expressed in many human cancer cells, siRNA was used to determine which of the two ABT-263 targets, when inhibited, would phenocopy the synergistic activity observed for ABT-263 in combination with AZD1152. When transfected into cancer cells of different tumor origin (HCT116, DLD1, EJ1, PC3, D54MG), Bcl-X_L, but not luciferase, Bcl-2, or Mcl-1 siRNA exhibited a synergistic inhibition of cell growth in combination with AZD1152 (FIG. 9E-FIG. 9G and data not shown). Therefore, inhibition of Bcl-X_L, but not Bcl-2, cooperates with Aurora B inhibition to induce cell death in these cell lines. Bcl-X_L and Aurora B siRNAs were also synergistically antiproliferative (FIG. 9H). Collectively, these data indicate that the synergistic activity of VX-680 and ABT-263 can be fully ascribed to inhibition of Aurora B and Bcl-X_L.

ABT-263 triggers rapid apoptosis in polyploid cells.

As polyploidy represents the ultimate cell fate associated with sustained inhibition of Aurora B, the inventors set out to determine whether Bcl-X_L inhibition and polyploidization were synergistically cytotoxic, independently of Aurora B. The CPC is an epistasis group comprising Aurora B, survivin, INCENP, and borealin, and is the core of the mitotic spindle assembly checkpoint (See, Ruchaud, S., Carmena, M. & Earnshaw, W.C., "Chromosomal passengers: conducting cell division," *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 798-812 (2007)). Disruption of the CPC results in cytokinesis failure and polyploidy (See, Honda, R., Körner, R. & Nigg, E.A., "Exploring the functional interactions between

Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis," *Mol Biol Cell* 14, 3325-41 (2003)). In accordance with INCENP's role to safeguard against polyploidy (See, Uren, A.G. et al., "Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype," *Curr Biol* 10, 1319-28 (2000)). INCENP siRNA induced morphological hallmarks of polyploidy, such as grossly enlarged cells with multiple micronuclei (data not shown). Knockdown of INCENP was synergistically antiproliferative with Bcl-X_L knockdown (FIG. 10A-B), suggesting that inhibition of Bcl-XL is deleterious for polyploid cells. However, targeting INCENP with siRNA also delocalizes Aurora B and inhibits its activity (See, Klein, U.R., Nigg, E.A. & Gruneberg, U., "Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP," *Mol Biol Cell* 17, 2547-58 (2006)). Therefore, the effect of INCENP siRNA cannot be fully dissociated from disruption of Aurora B. To conclusively determine whether polyploidy *per se* was sufficient to sensitize cells to Bcl-X_L inhibition, cells were treated with AZD1152 to induce polyploidy, washed out the drug, and the polyploid cells cultured until Aurora B activity was restored. Polyploidy was evidenced by elevated expression of p53 (FIG. 10C), a surrogate for polyploidization in cell harboring wildtype p53 (See, Gizatullin, F. et al., "The Aurora Kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function," *Cancer Res.* 66, 7668-77. (2006), Li, J. et al., "Inhibition of Aurora B kinase sensitizes a subset of human glioma cells to TRAIL concomitant with induction of TRAIL-R2," *Cell Death Differ*, Epub ahead of print (2008) and Kojima, K., Konopleva, M., Tsao, T., Nakakuma, H. & Andreeff, M., "Concomitant inhibition of Mdm2-p53 interaction and Aurora Kinases activates the p53-dependent postmitotic checkpoints and synergistically induces p53-mediated mitochondrial apoptosis along with reduced endoreduplication in acute myelogenous leukemia," *Blood* 112, 2886-95 (2008)) and by the gross morphological increase in cell size and multinucleation (FIG. 10D). Following AZD1152 wash-out, histone H3 phosphorylation returned to untreated levels indicating that Aurora B activity had been fully restored (FIG. 10C) in polyploid cells (FIG. 10D). ABT-263 induced Caspase-3 activity and loss of viability in polyploid cells, but not diploid cells, independently of the activation status of Aurora B (FIG. 10E-F). These data

suggest that acute induction of polyploidy renders cell survival dependent on the anti-apoptotic activity of Bcl-X_L.

Polyploidization shifts the survival burden to Bcl-X_L

The multidomain apoptotic proteins BAX and BAK together constitute an obligatory portal to apoptosis (See, Wei, M.C. et al., "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death," *Science* 292, 727-30 (2001) and Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R. & Thompson, C.B., "BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of BAX and BAK," *Genes Dev* 15, 1481-6 (2001)). To begin to shed light on the mechanisms through which Bcl-X_L neutralization elicits cell death in polyploid cells, the activation of BAX and BAK in cells rendered polyploid with AZD1152 using antibodies that selectively recognize the active BAX and BAK conformers was examined. Addition of ABT-263 to polyploid HCT116, D54MG, SW620, and EJ1 cells rapidly and synergistically induced BAX and BAK activation (FIG. 11A and FIG. 14). The activation of BAX and BAK was followed by mitochondrial release of cytochrome C into the cytosol, a decisive event in the commitment to apoptosis (FIG. 11B).

The pro-apoptotic function of BAX and BAK is normally inhibited by anti-apoptotic members of the Bcl-2 family such as Bcl-X_L and Mcl-1, and it is the balance of interactions between BH3-only and multidomain proteins that sets the threshold for apoptosis through the intrinsic pathway (See, Kim, H. et al., "Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies," *Nat Cell Biol* 8, 1348-58 (2006) and Willis, S.N. et al., "Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not BAX or BAK," *Science* 315, 856-9 (2007)). In contrast to what was observed in polyploid cells, neutralization of Bcl-X_L is not normally sufficient to trigger apoptosis in diploid or aneuploid cells (FIG. 8C). To elucidate how polyploidization engages elements of the apoptotic machinery and renders polyploid cell survival Bcl-X_L-dependent, the Bcl-2 network was monitored at the mRNA and protein level in response to polyploidization. Hierarchical clustering of Bcl-2 network genes indicated that the transcriptional profiles of polyploidization (VX-680 and AZD1152) were consistently most similar compared to Aurora A inhibition (MLN8054), though they differed across

cell lines (FIG. 15). At the protein level, a number of pro-apoptotic BH3-only proteins were upregulated following polyploidization (FIG. 11C). An increase in PUMA and NOXA was a conserved effect across cell lines; whereas, tBID, BIK, BIM, and BAX increased in a cell line-dependent manner. Though only subtle changes in expression were observed for Bcl-2 and Bcl-X_L, Mcl-1 was significantly reduced in HCT116, SW620, and EJ1 cells (FIG. 11C and data not shown). NOXA binds to and inhibits the anti-apoptotic function of Mcl-1 (See, Chen, L. et al., "Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function," *Mol Cell* 17, 393-403 (2005)). Therefore, the upregulation of NOXA in D54MG is predicted to antagonize Mcl-1, though the abundance of Mcl-1 in D54MG cells was not reduced (FIG. 11C). Collectively, polyploidization induced effectors of apoptosis while compromising Mcl-1 function. As cell viability is maintained during this period of polyploidization, it was inferred that the burden to support viability is shifted from Mcl-1 to Bcl-X_L.

While gene expression represents one level at which the Bcl-2 network is regulated, the collection of binding events between pro- and anti-apoptotic proteins ultimately determines the balance between survival and apoptosis. The Bcl-X_L and Mcl-1 interactomes were empirically defined and monitored the effect of polyploidization on these interactions. HCT116 cells were treated with DMSO, ABT-263, AZD1152, or AZD1152 and ABT-263. Endogenous Bcl-X_L or Mcl-1 was then immunoprecipitated, and the immune complexes were analyzed by in-gel tryptic digestion and LC-MS/MS. The protein identifications were compiled from all treatments yielding a composite interactome that represents all Bcl-X_L and Mcl-1 interactions detected (FIG. 16). Interactions were subsequently confirmed by co-immunoprecipitation and immunoblotting under each treatment condition (FIG. 11D-E). None of the coimmunoprecipitated proteins were detected in anti-S6K1 immunoprecipitates using an IgG isotype-matched antibody (FIG. 1E-F), highlighting the specificity of these interactions. In polyploid cells (AZD1152), the interactions of Bik and tBid with Bcl-X_L were increased while the binding of BAD, BIM, BAX, and PUMA was unchanged (FIG. 11E) indicating that Bcl-X_L was increasingly burdened by pro-apoptotic proteins upon polyploidization. Consistent with the reduction of Mcl-1 protein level, a reduced amount

of Mcl-1 was captured by immunoprecipitation in polyploid cells (FIG. 11E). In addition, there was a stoichiometric increase in NOXA binding during polyploidization (FIG. 11E). Furthermore, the association of Mcl-1 with Bim and Puma was significantly attenuated in polyploid cells (FIG. 11E), suggesting that the reduction of Mcl-1 and concomitant increase of NOXA was sufficient to partially neutralize Mcl-1.

Identification of Bcl-2 network components required for Bcl-X_L/Aurora B inhibitor synergy

Although multiple Bcl-2 family proteins were modulated by polyploidization at the levels of expression and/or protein-protein interaction, it was unclear which, if any, were essential for sensitization of polyploid cells to Bcl-X_L inhibition. An siRNA screen was carried out emphasizing the Bcl-X_L and Mcl-1 interactomes, to identify elements of the Bcl-2 network that, upon knockdown, could rescue viability in the presence of dual inhibition of Aurora B and Bcl-X_L. Multiple siRNAs targeting NOXA, BAX, and to a lesser extent, those targeting BAK were found to rescue polyploid cells from ABT-263-mediated cell death (FIG. 12A and FIG. 17). In fact, siRNA-mediated depletion of NOXA and BAX in several cell lines rendered polyploid cells resistant to Bcl-X_L inhibition (FIG. 12B and FIG. 17). These data imply causal roles for NOXA and BAX in the synergistic activity of Bcl-X_L inhibition in polyploid cells.

To further understand how Noxa inhibition protects polyploid cells from ABT-263-mediated apoptosis, the Bcl-X_L and Mcl-1 interactomes were compared before and after polyploidization in cells transfected with a control or NOXA siRNA. As before, a reduction of Mcl-1 protein and a stoichiometric increase in NOXA binding to Mcl-1 was observed in cells made polyploid using AZD1152 (FIG. 12D). Depletion of NOXA restored the binding of Puma and Bim to Mcl-1 in polyploid cells indicating that the capacity of Mcl-1 to bind pro-apoptotic effectors had been restored. Though it is sufficient to cause Bcl-X_L dependence, the inhibition of Mcl-1 during polyploidization appears incomplete, as apoptosis induced by AZD1152/ABT-263 is augmented by Mcl-1 knockdown (FIG. 19).

Polyploidization-mediated apoptosis involves a mechanism distinct from dual Aurora B/ Bcl-X_L inhibition

Cancer cells accumulate viable cell mass during polyploidization and continue to do so for up to a week after the addition of AZD1152. However, 10 days after the onset of polyploidy, viability sharply declines as cells succumb to the polyploidization process (FIG. 18). To determine whether apoptosis secondary to prolonged polyploidization engages the same, albeit delayed, apoptotic program as dual inhibition of Aurora B/ Bcl-X_L, an additional siRNA rescue screen were performed to identify components of the Bcl-2 network that, when functionally disrupted, would preserve the long-term viability of polyploid cells (FIG. 12E). In contrast to the predominant requirement of BAX and NOXA for acute apoptosis induced by the AZD1152/ABT-263 combination, siRNAs against BAX and BAK confer similar degrees of protection, and siRNAs against BIK and BID, which were ineffective in the earlier rescue screen, protected cells from polyploidization-mediated loss of viability (FIG. 12F). Furthermore, depletion of NOXA failed to provide any protective effect in this setting (FIG. 12F).

ABT-263 enhances the efficacy of Aurora Kinase inhibitors *in vivo*

Although Aurora Kinase inhibitors have been shown to be efficacious in preclinical studies, targeting Bcl-X_L in polyploid tumor cells may produce efficacy superior to Aurora Kinase inhibitors as monotherapy. This was assessed by comparing the antitumor efficacy of single agent AZD1152 treatment to the combination of AZD1152/ABT-263 in a stringent and therapeutically relevant setting: well-established, large tumors (~0.5 gram) and with the maximum tolerated dose of AZD1152. AZD1152 as a single agent produced significant tumor growth inhibition in the HCT116 colon carcinoma model, though tumors started to recover from therapy within one week (as evidenced by tumor regrowth). In contrast, the combination regimen of AZD1152/ABT-263 resulted in a rapid and more sustained tumor regression that persisted for at least 2 weeks (FIG. 13A). In tumors that were pretreated for 3 days with AZD1152, an induction in p53 was observed, a surrogate marker of polyploidization (FIG. 6B). The active BAX conformer was detected within 4 hours of ABT-263 treatment in tumors

from AZD1152-treated mice, but not in naive tumors, reflecting the rapid onset of ABT-263-mediated apoptosis in polyploid tumor cells (FIG. 13B).

One skilled in the art would readily appreciate that the present disclosure is well adapted to carry out the objects and obtain the ends and advantages mentioned, as well as those inherent therein. The molecular complexes and the methods, procedures, treatments, molecules, specific compounds described herein are presently representative of preferred aspects, are exemplary, and are not intended as limitations on the scope of the disclosure. It will be readily apparent to one skilled in the art that varying substitutions and modifications may be made to the disclosure disclosed herein without departing from the scope and spirit of the disclosure.

All patents and publications mentioned in the specification are indicative of the levels of those skilled in the art to which the disclosure pertains. All patents and publications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication was specifically and individually indicated to be incorporated by reference. The disclosure illustratively described herein suitably may be practiced in the absence of any element or elements, limitation or limitations which is not specifically disclosed herein. Thus, for example, in each instance herein any of the terms "comprising," "consisting essentially of" and "consisting of" may be replaced with either of the other two terms. The terms and expressions which have been employed are used as terms of description and not of limitation, and there is no intention that in the use of such terms and expressions of excluding any equivalents of the features shown and described or portions thereof, but it is recognized that various modifications are possible within the scope of the disclosure claimed. Thus, it should be understood that although the present disclosure has been specifically disclosed by preferred aspects and optional features, modification and variation of the concepts herein disclosed may be resorted to by those skilled in the art, and that such modifications and variations are considered to be within the scope of this disclosure as defined by the appended claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of treating a patient suffering from cancer, the method comprising the steps of:

a) administering to a patient suffering from cancer a therapeutically effective amount of at least one polyploidy inducing agent; and

b) administering to the patient a therapeutically effective amount of at least one Bcl-2 family protein inhibitor.

2. The method of claim 1, wherein the at least one polyploidy inducing agent is an Aurora Kinase inhibitor.

3. The method of claim 2, wherein the Aurora Kinase inhibitor is an Aurora Kinase B inhibitor.

4. The method of claim 3, wherein the Aurora Kinase B inhibitor is VX-680, AZD1152, ZM44739 or Hersperadin.

5. The method of claim 1, wherein the Bcl-2 family protein inhibitor is ABT-263, ABT-737, a Bcl-X_L selective inhibitor or combinations thereof.

6. A combination of therapeutic agents for use in treating a patient suffering from cancer, wherein said combination comprises:

a) at least one polyploidy inducing agent for use in inducing polyploidization in one or more cancer cells in the patient; and

b) at least one Bcl-2 family protein inhibitor.

7. The combination of claim 6, wherein the at least one polyploidy inducing agent is an Aurora Kinase inhibitor.

8. The combination of claim 7, wherein the Aurora Kinase inhibitor is an Aurora Kinase B inhibitor.

9. The combination of claim 8, wherein the Aurora Kinase B inhibitor is VX-680, AZD1152, ZM44739 or Hersperadin.

10. The combination of claim 6, wherein the Bcl-2 family protein inhibitor is ABT-263, ABT-737, a Bcl-X_L selective inhibitor or combinations thereof.

11. A method of classifying a patient for eligibility for treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor, the method comprising the steps of:

a) providing a test sample from a patient;

b) determining the presence or absence of at least one mutation in at least one gene selected from the group consisting of: a BAX gene, a BAK gene or a NOXA gene in the test sample; and

c) classifying the patient as being eligible for receiving treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor based on the presence or absence of at least one mutation as determined in step b).

12. The method of claim 11, wherein the polyploidy inducing agent is an Aurora Kinase inhibitor.

13. The method of claim 12, wherein the Aurora Kinase inhibitor is an Aurora Kinase A inhibitor, an Aurora Kinase B inhibitor, an Aurora Kinase C inhibitor or combinations thereof.

14. The method of claim 13, wherein the Aurora Kinase inhibitor is an Aurora Kinase B inhibitor.

15. The method of claim 14, wherein the Aurora Kinase B inhibitor is AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 or Hersperadin.

16. The method of claim 11, wherein the Bcl-2 family protein inhibitor is ABT-263, ABT-737, a Bcl-X_L selective inhibitor or combinations thereof.

17. The method of claim 11, wherein the test sample comprises a tissue sample.

18. The method of claim 17, wherein the tissue sample comprises a peripheral blood sample, a tumor tissue or a suspected tumor tissue, a thin layer cytological sample, a fine needle aspirate sample, a bone marrow sample, a lymph node sample, a urine sample, an ascites sample, a lavage sample, an esophageal brushing sample, a bladder or lung wash sample, a spinal fluid sample, a brain fluid sample, a ductal aspirate sample, a nipple discharge sample, a pleural effusion sample, a fresh frozen tissue sample, a paraffin embedded tissue sample or an extract or processed sample produced from any of a peripheral blood sample, a tumor tissue or a suspected tumor tissue, a thin layer cytological sample, a fine needle aspirate sample, a bone marrow sample, a urine sample, an ascites sample, a lavage sample, an esophageal brushing sample, a bladder or lung wash sample, a spinal fluid sample, a brain fluid sample, a ductal aspirate sample, a nipple discharge sample, a pleural effusion sample, a fresh frozen tissue sample or a paraffin embedded tissue sample.

19. The method of claim 11, wherein the determining step (b) is performed by *in situ* hybridization.

20. The method of claim 19, wherein the *in situ* hybridization is performed with a nucleic acid probe that is fluorescently labeled.

21. The method of claim 20, wherein the *in situ* hybridization is performed with at least two nucleic acid probes.

22. The method of claim 20, wherein the *in situ* hybridization is performed with a peptide nucleic acid probe.

23. The method of claim 11, wherein the determining step (b) is performed by polymerase chain reaction.

24. The method of claim 11, wherein the patient is also being treated with chemotherapy, radiation or combinations thereof.

25. A method of monitoring a patient suffering from cancer and being treated with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor, the method comprising the steps of:

a) providing a test sample from a patient suffering from cancer and currently being treated with at least one polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor;

b) determining the presence or absence of at least one mutation in at least one gene selected from the group consisting of: a BAX gene, a BAK gene or a NOXA gene in the test sample; and

c) determining whether the patient should continue to be treated with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing

agent and a Bcl-2 family protein inhibitor based on the presence or absence of at least one mutation as determined in step b).

26. The method of claim 25, wherein the polyploidy inducing agent is an Aurora Kinase inhibitor.

27. The method of claim 26, wherein the Aurora Kinase inhibitor is an Aurora Kinase A inhibitor, an Aurora Kinase B inhibitor, an Aurora Kinase C inhibitor or combinations thereof.

28. The method of claim 27, wherein the Aurora Kinase inhibitor is an Aurora Kinase B inhibitor.

29. The method of claim 28, wherein the Aurora Kinase B inhibitor is AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 or Hersperadin.

30. The method of claim 25, wherein the Bcl-2 family protein inhibitor is ABT-263, ABT-737, a Bcl-X_L selective inhibitor or combinations thereof.

31. The method of claim 25, wherein the test sample comprises a tissue sample.

32. The method of claim 31, wherein the tissue sample comprises a peripheral blood sample, a tumor tissue or a suspected tumor tissue, a thin layer cytological sample, a fine needle aspirate sample, a bone marrow sample, a lymph node sample, a urine sample, an ascites sample, a lavage sample, an esophageal brushing sample, a bladder or lung wash sample, a spinal fluid sample, a brain fluid sample, a ductal aspirate sample, a nipple discharge sample, a pleural effusion sample, a fresh frozen tissue sample, a paraffin embedded tissue sample or an extract or processed sample produced from any of a

peripheral blood sample, a tumor tissue or a suspected tumor tissue, a thin layer cytological sample, a fine needle aspirate sample, a bone marrow sample, a urine sample, an ascites sample, a lavage sample, an esophageal brushing sample, a bladder or lung wash sample, a spinal fluid sample, a brain fluid sample, a ductal aspirate sample, a nipple discharge sample, a pleural effusion sample, a fresh frozen tissue sample or a paraffin embedded tissue sample.

33. The method of claim 25, wherein the determining step (b) is performed by *in situ* hybridization.

34. The method of claim 33, wherein the *in situ* hybridization is performed with a nucleic acid probe that is fluorescently labeled.

35. The method of claim 33, wherein the *in situ* hybridization is performed with at least two nucleic acid probes.

36. The method of claim 33, wherein the *in situ* hybridization is performed with a peptide nucleic acid probe.

37. The method of claim 25, wherein the determining step (b) is performed by polymerase chain reaction.

38. The method of claim 25, wherein the patient is also being treated with chemotherapy, radiation or combinations thereof.

39. A method of classifying a patient as having a cancer that is resistant to treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor, the method comprising the steps of:

a) providing a test sample from a patient suffering from cancer;

b) determining the presence or absence of at least one mutation in at least one gene selected from the group consisting of: a BAX gene, a BAK gene or a NOXA gene in the test sample; and

c) classifying the patient as having a cancer that is resistant to treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination of a polyploidy inducing agent and a Bcl-2 family protein inhibitor based on the presence or absence of at least one mutation determined in step b).

40. The method of claim 39, wherein the polyploidy inducing agent is an Aurora Kinase inhibitor.

41. The method of claim 40, wherein the Aurora Kinase inhibitor is an Aurora Kinase A inhibitor, an Aurora Kinase B inhibitor, an Aurora Kinase C inhibitor or combinations thereof.

42. The method of claim 41, wherein the Aurora Kinase inhibitor is an Aurora Kinase B inhibitor.

43. The method of claim 42, wherein the Aurora Kinase B inhibitor is AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 or Hersperadin.

44. The method of claim 39, wherein the Bcl-2 family protein inhibitor is ABT-263, ABT-737, a Bcl-X_L selective inhibitor or combinations thereof.

45. The method of claim 39, wherein the test sample comprises a tissue sample.

46. The method of claim 45, wherein the tissue sample comprises a peripheral blood sample, a tumor tissue or a suspected tumor tissue, a thin layer cytological sample, a fine needle aspirate sample, a bone marrow sample, a lymph node sample, a urine sample, an ascites sample, a lavage sample, an esophageal brushing sample, a bladder or lung wash sample, a spinal fluid sample, a brain fluid sample, a ductal aspirate sample, a nipple discharge sample, a pleural effusion sample, a fresh frozen tissue sample, a paraffin embedded tissue sample or an extract or processed sample produced from any of a peripheral blood sample, a tumor tissue or a suspected tumor tissue, a thin layer cytological sample, a fine needle aspirate sample, a bone marrow sample, a urine sample, an ascites sample, a lavage sample, an esophageal brushing sample, a bladder or lung wash sample, a spinal fluid sample, a brain fluid sample, a ductal aspirate sample, a nipple discharge sample, a pleural effusion sample, a fresh frozen tissue sample or a paraffin embedded tissue sample.

47. The method of claim 39, wherein the determining step (b) is performed by *in situ* hybridization.

48. The method of claim 47, wherein the *in situ* hybridization is performed with a nucleic acid probe that is fluorescently labeled.

49. The method of claim 47, wherein the *in situ* hybridization is performed with at least two nucleic acid probes.

50. The method of claim 47, wherein the *in situ* hybridization is performed with a peptide nucleic acid probe.

51. The method of claim 39, wherein the determining step (b) is performed by polymerase chain reaction.

52. The method of claim 39, wherein the patient is also being treated with chemotherapy, radiation or combinations thereof.

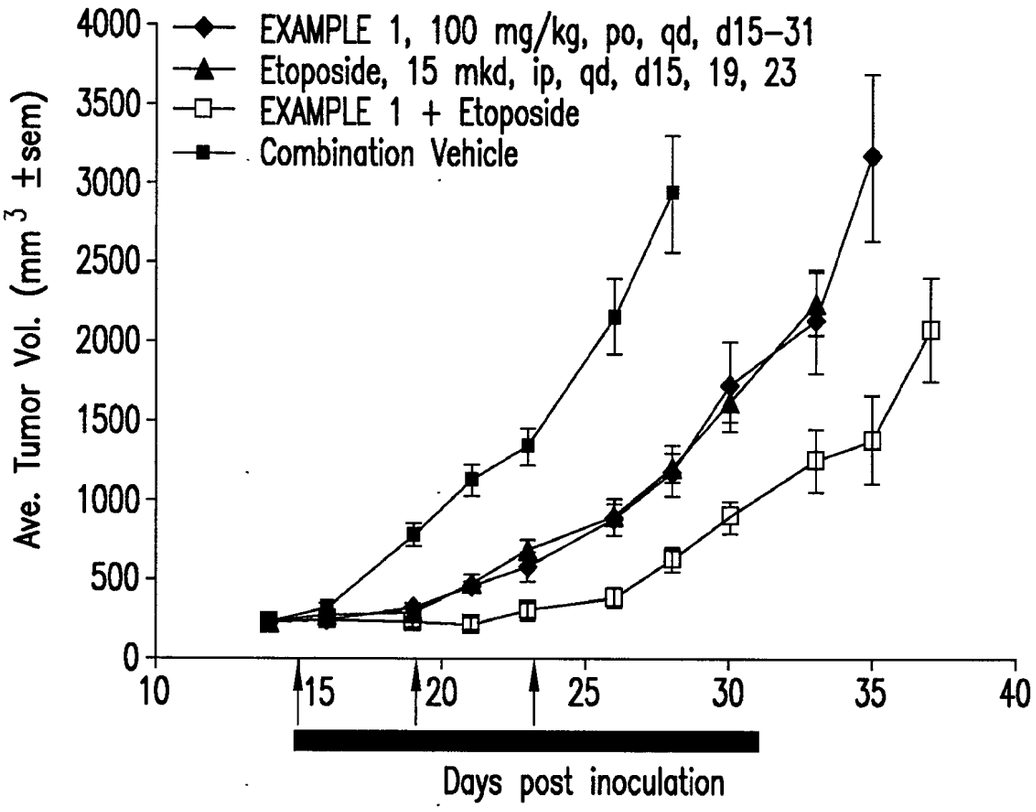

EXAMPLE 1, 100 mg/kg, po, qd, d15–31
Etoposide, 15 mkd, ip, qd, d15, 19, 23
EXAMPLE 1 + Etoposide
Combination Vehicle
Ave. Tumor Vol. (mm3 ±sem)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
15
20
25
30
35
40
Days post inoculation

FIG.1

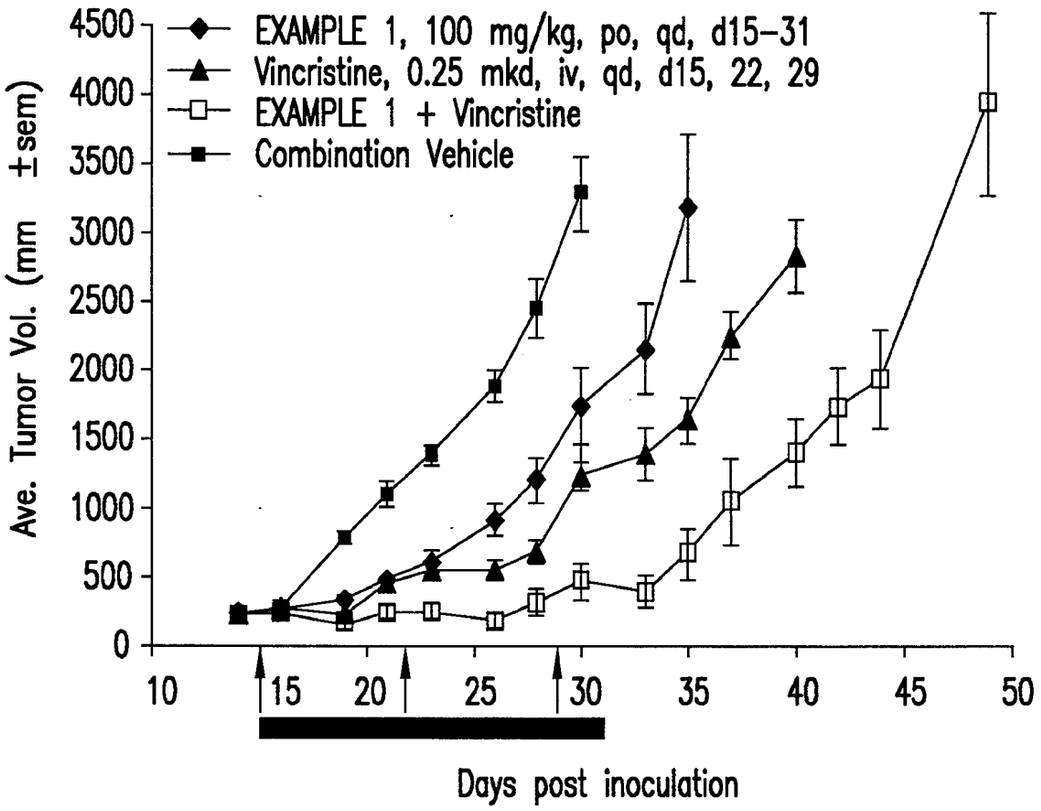

EXAMPLE 1, 100 mg/kg, po, qd, d15–31
Vincristine, 0.25 mkd, iv, qd, d15, 22, 29
EXAMPLE 1 + Vincristine
Combination Vehicle
Ave. Tumor Vol. (mm ±sem)
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Days post inoculation

FIG.2

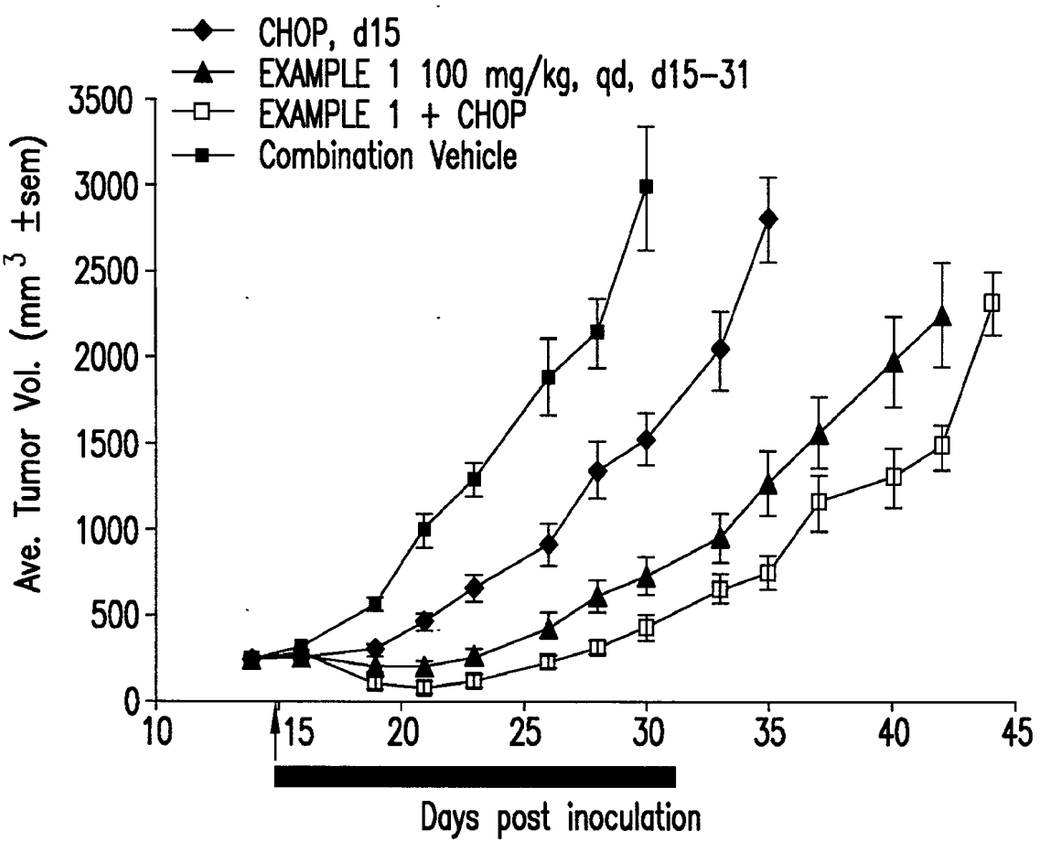

CHOP, d15
EXAMPLE 1 100 mg/kg, qd, d15–31
EXAMPLE 1 + CHOP
Combination Vehicle
Ave. Tumor Vol. (mm3 ±sem)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
15
20
25
30
35
40
45
Days post inoculation

FIG.3

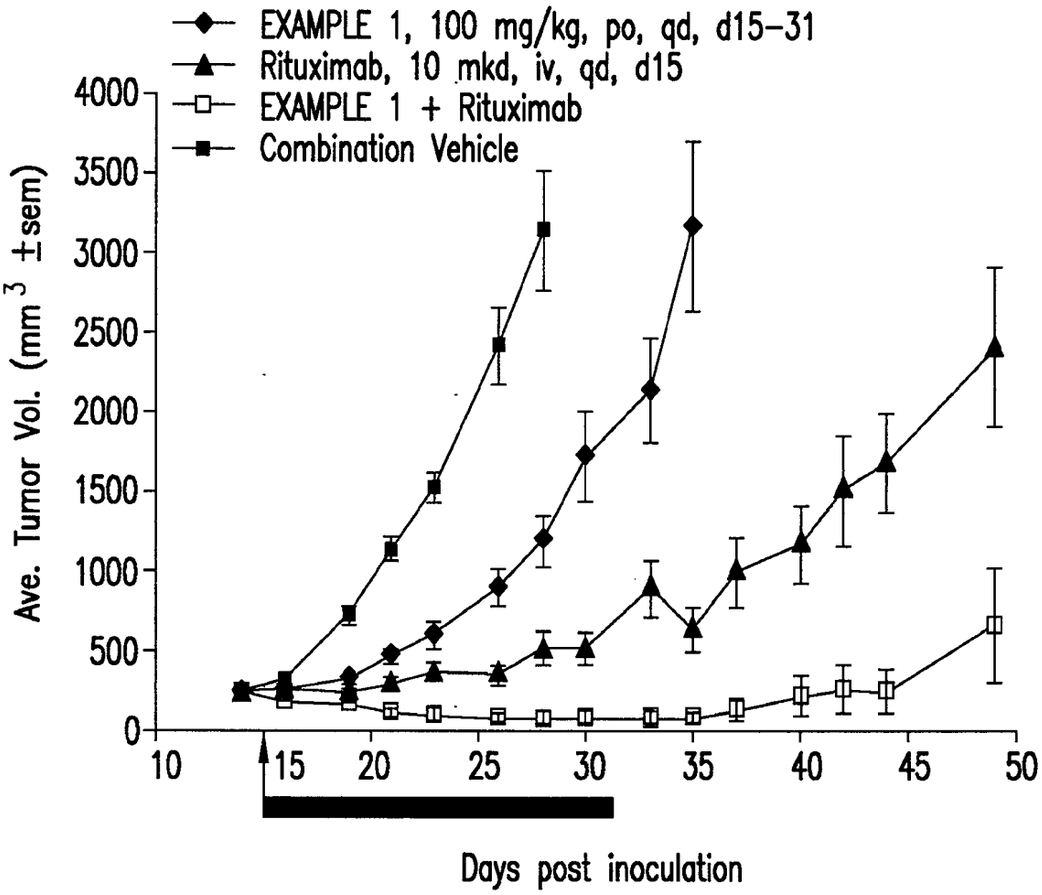

EXAMPLE 1, 100 mg/kg, po, qd, d15–31
Rituximab, 10 mkd, iv, qd, d15
EXAMPLE 1 + Rituximab
Combination Vehicle
Ave. Tumor Vol. (mm3 ±sem)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Days post inoculation

FIG.4

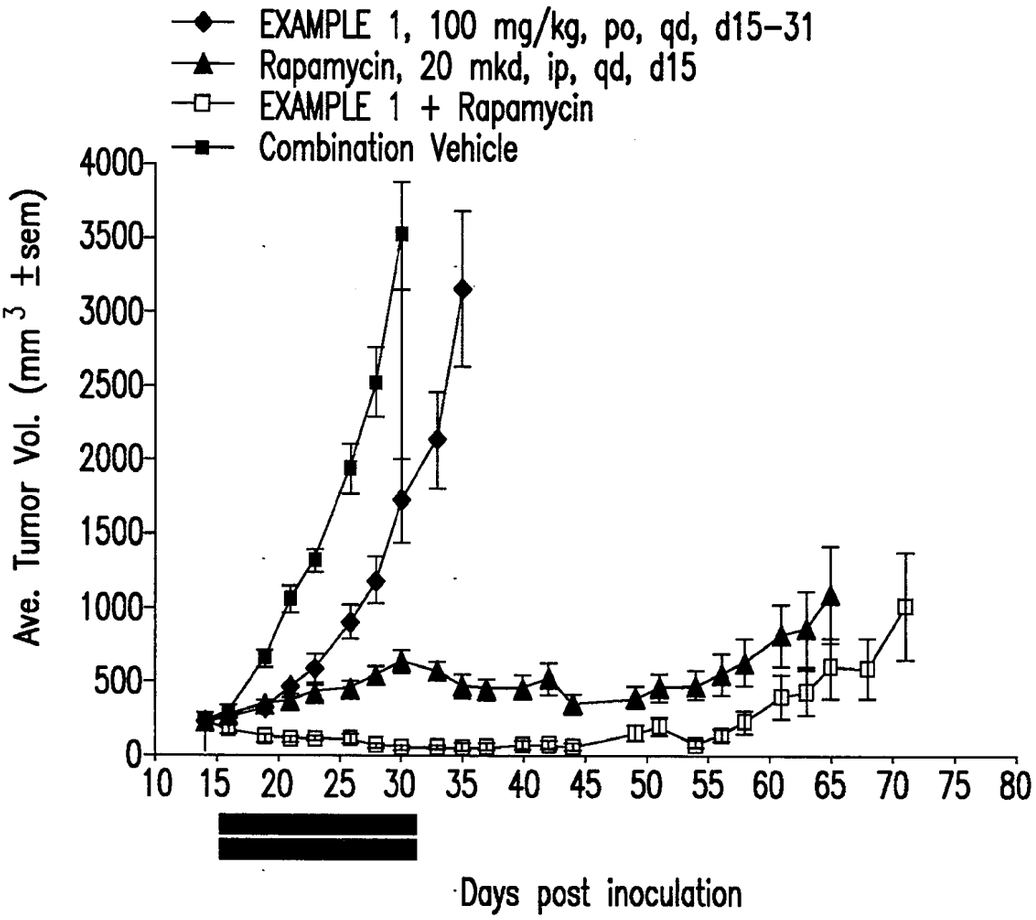

EXAMPLE 1, 100 mg/kg, po, qd, d15–31
Rapamycin, 20 mkd, ip, qd, d15
EXAMPLE 1 + Rapamycin
Combination Vehicle
Ave. Tumor Vol. (mm3 ±sem)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80
Days post inoculation

FIG.5

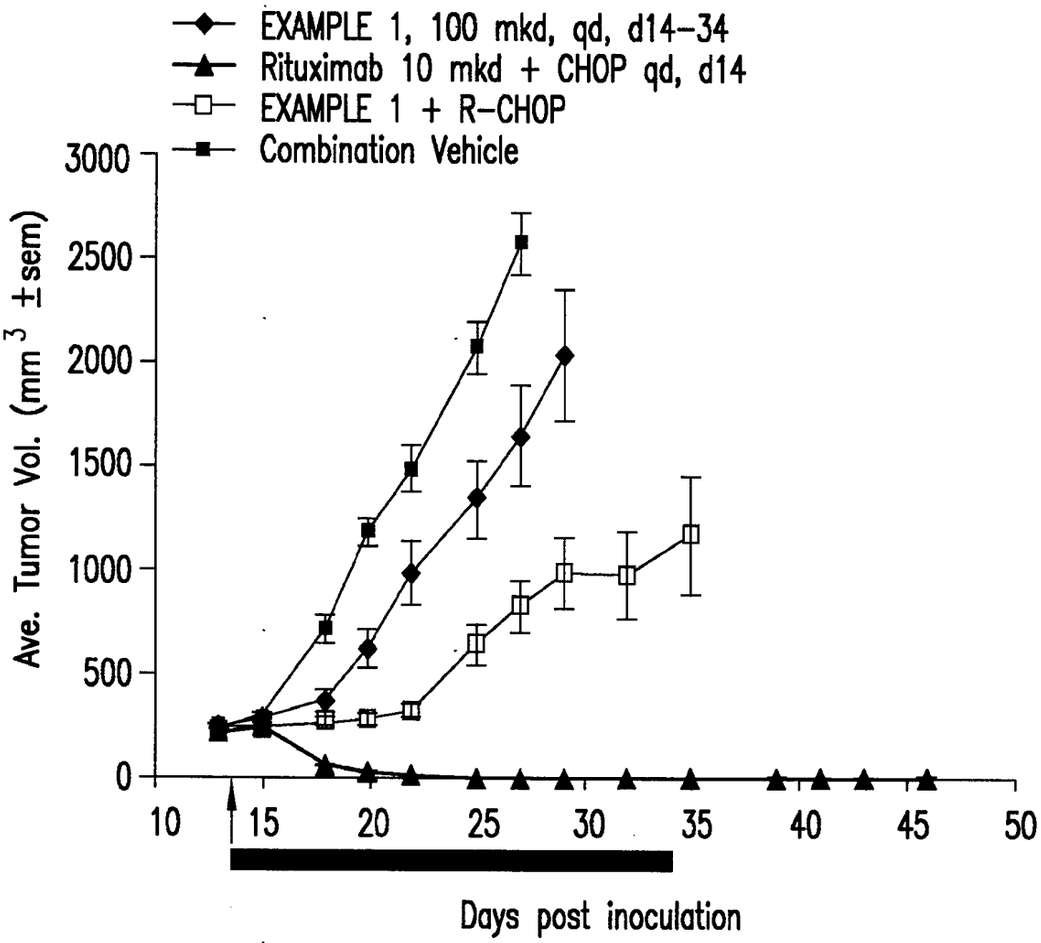

EXAMPLE 1, 100 mkd, qd, d14–34
Rituximab 10 mkd + CHOP qd, d14
EXAMPLE 1 + R-CHOP
Combination Vehicle
Ave. Tumor Vol. (mm3 ±sem)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Days post inoculation

FIG.6

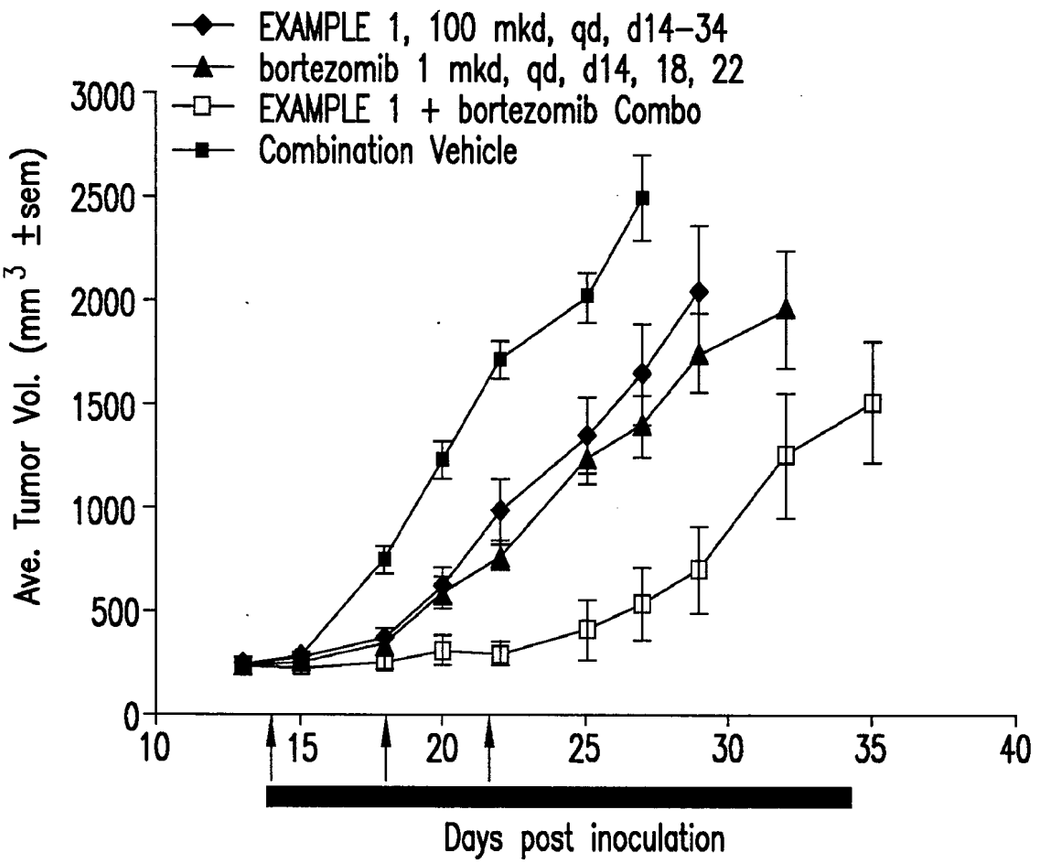

EXAMPLE 1, 100 mkd, qd, d14–34
bortezomib 1 mkd, qd, d14, 18, 22
EXAMPLE 1 + bortezomib Combo
Combination Vehicle
Ave. Tumor Vol. (mm3 ±sem)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
15
20
25
30
35
40
Days post inoculation

FIG.7

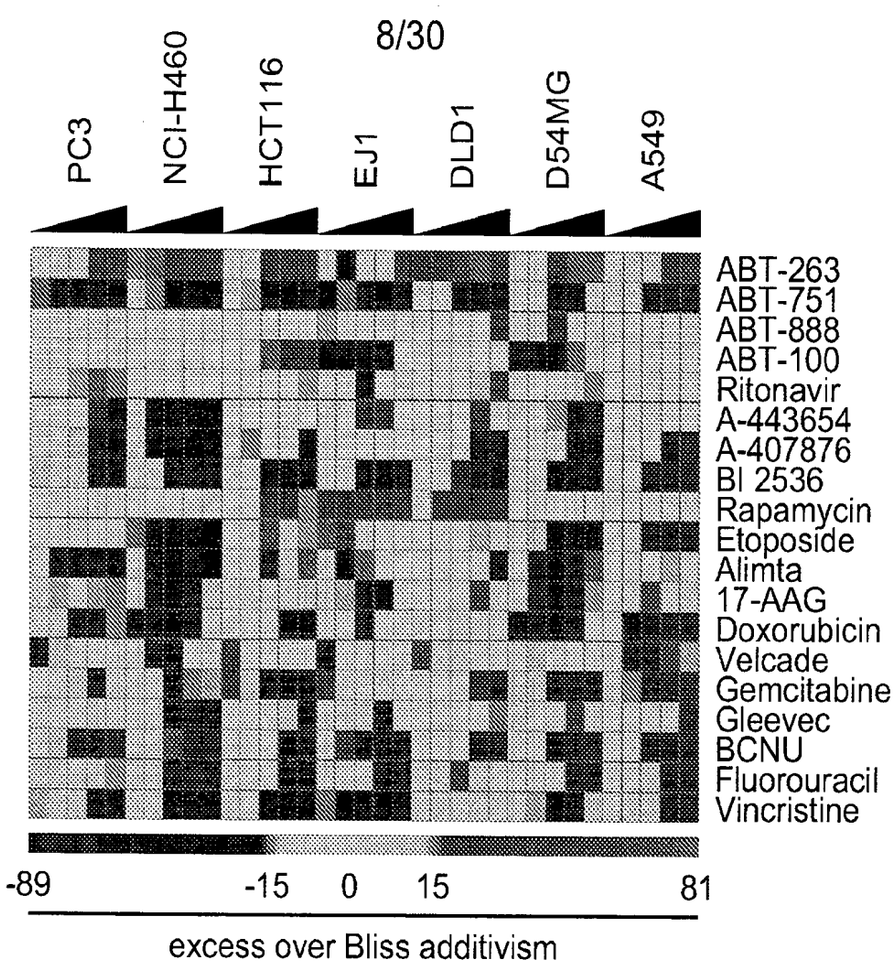

8/30
PC3
NCI-H460
HCT116
EJ1
DLD1
D54MG
A549
ABT-263
ABT-751
ABT-888
ABT-100
Ritonavir
A-443654
A-407876
BI 2536
Rapamycin
Etoposide
Alimta
17-AAG
Doxorubicin
Velcade
Gemcitabine
Gleevec
BCNU
Fluorouracil
Vincristine
-89
-15
0
15
81
excess over Bliss additivism

FIG.8A

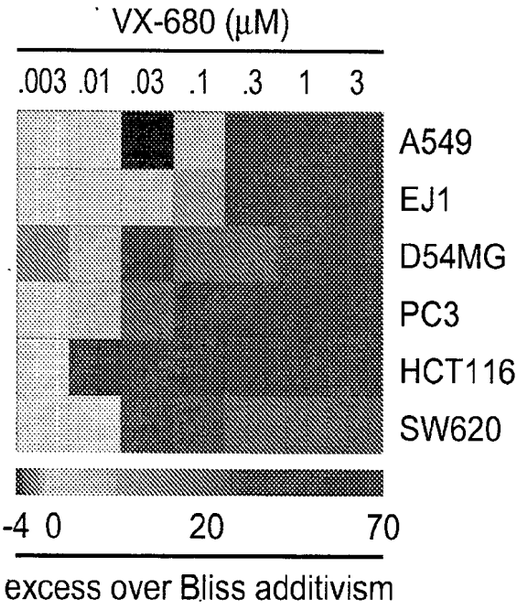

VX-680 (μM)
.003 .01 .03 .1 .3 1 3
A549
EJ1
D54MG
PC3
HCT116
SW620
-4 0
20
70
excess over Bliss additivism

FIG.8B

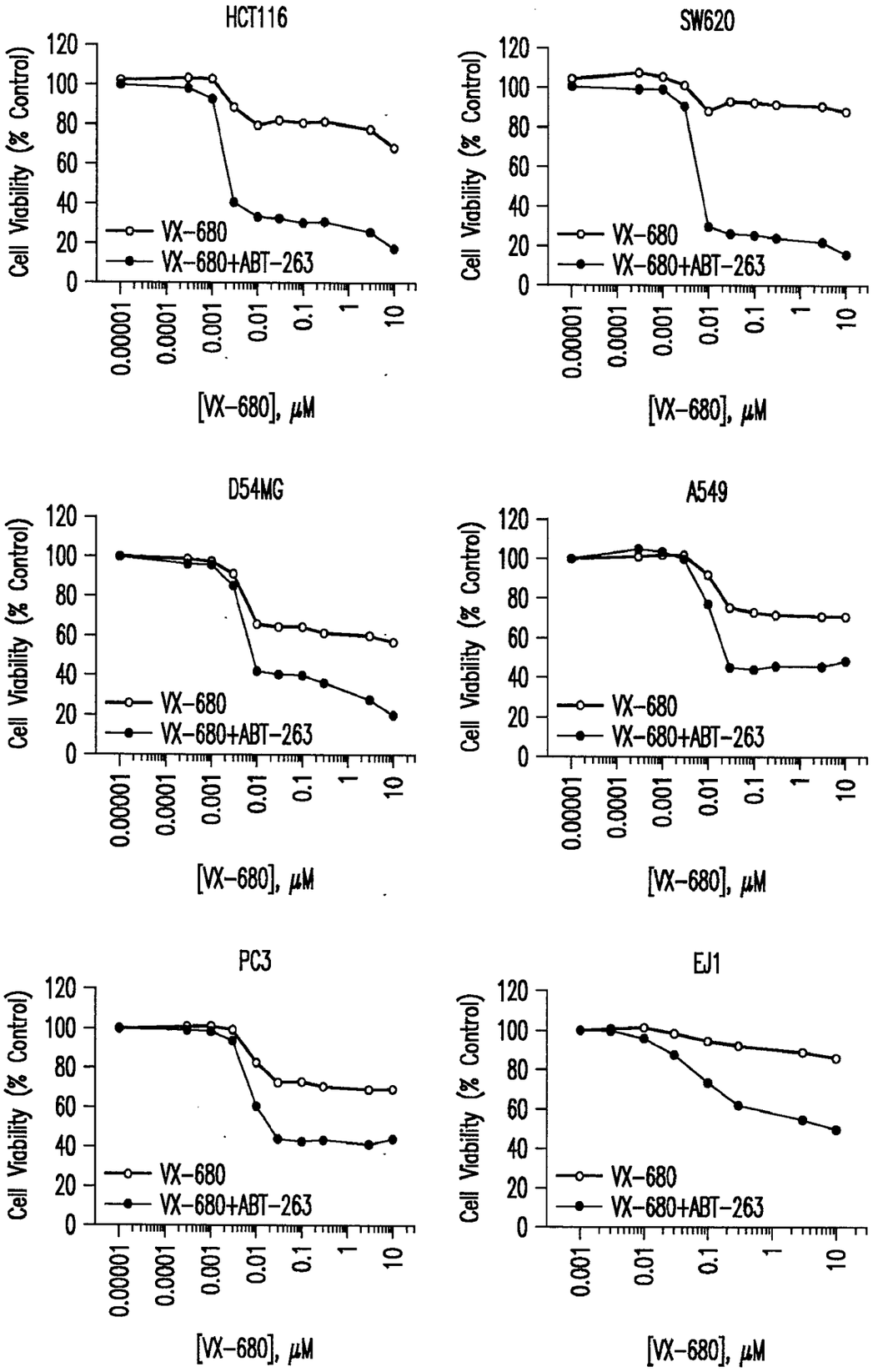

HCT116
SW620
D54MG
A549
PC3
EJ1
Cell Viability (% Control)
VX-680
VX-680+ABT-263
[VX-680], μM
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10

FIG.8C

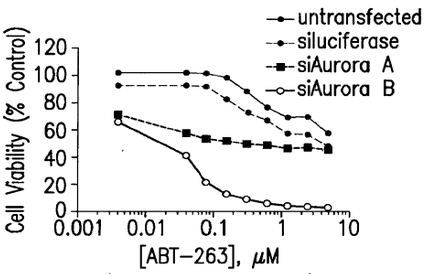


FIG.9A

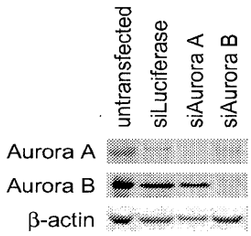


FIG.9B

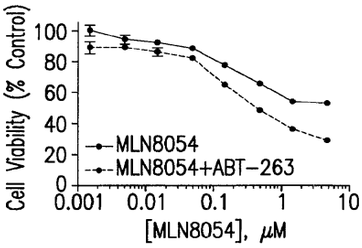


FIG.9C

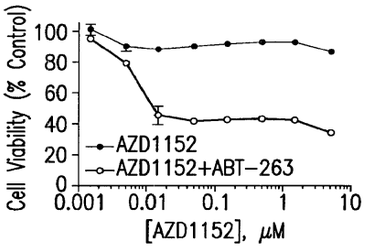


FIG.9D

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG.9E

FIG.9F

FIG.9G

FIG.9H

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

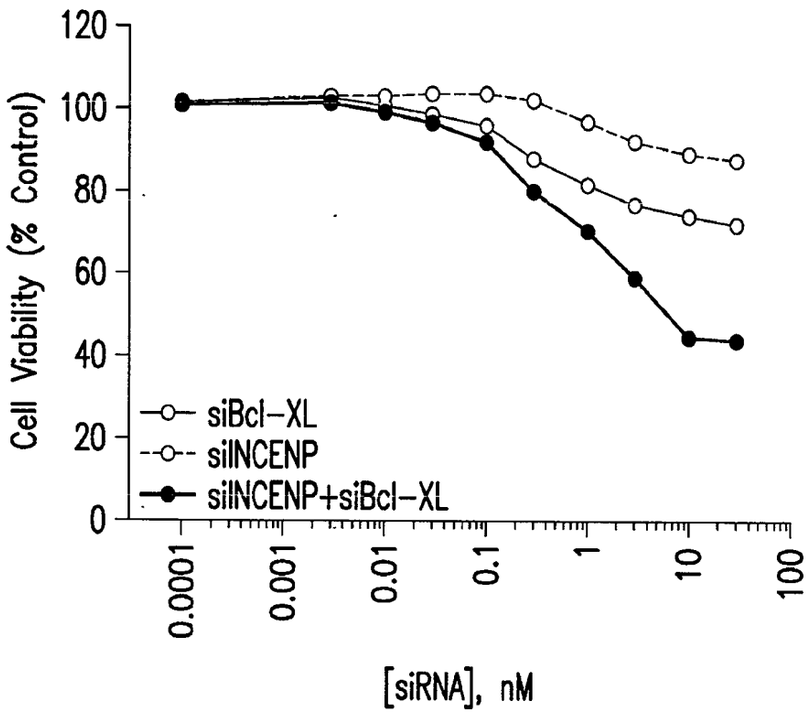


FIG.10A

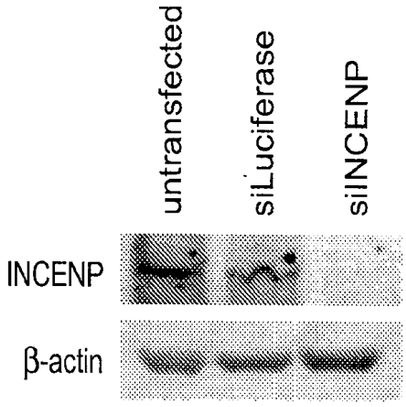


FIG.10B

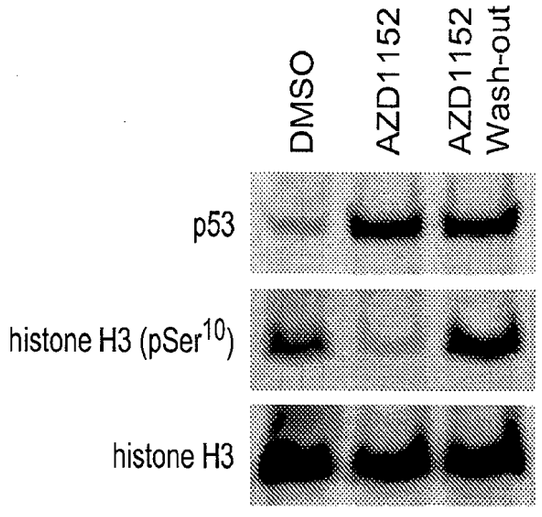


FIG.10C

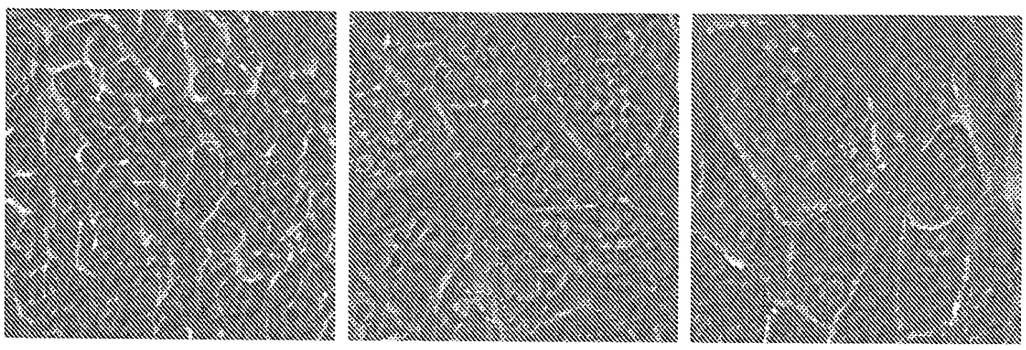


FIG.10D

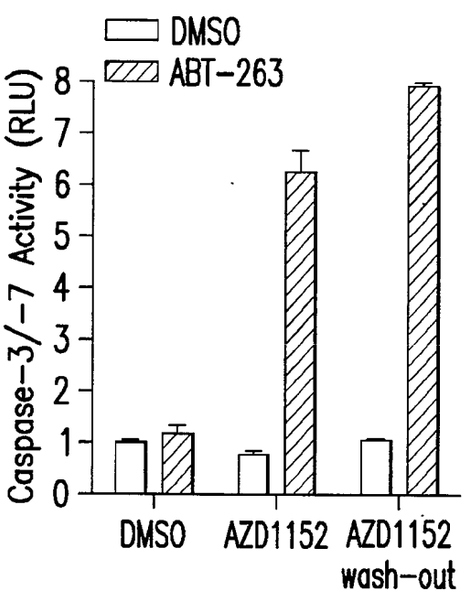


FIG.10E

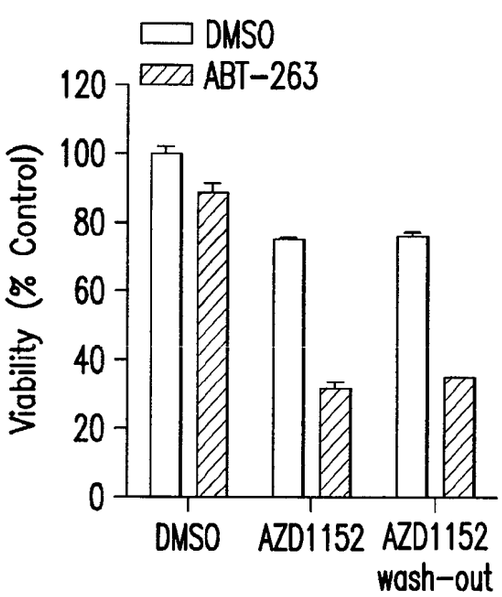


FIG.10F

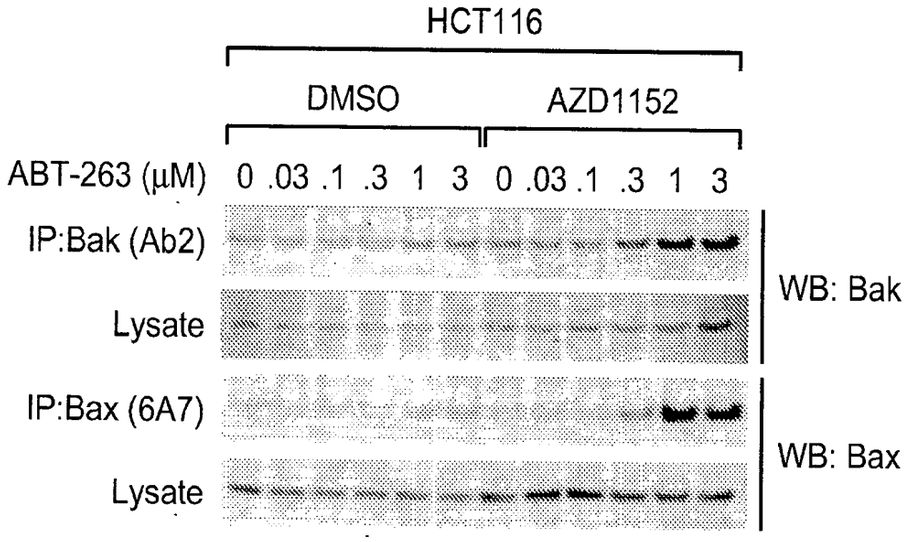


FIG.11A

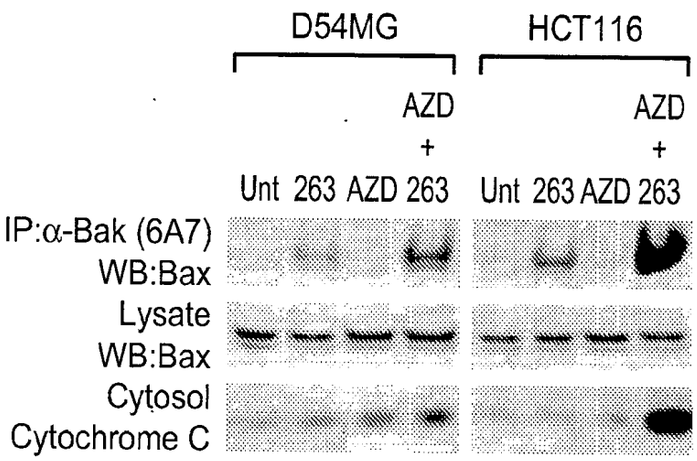


FIG.11B

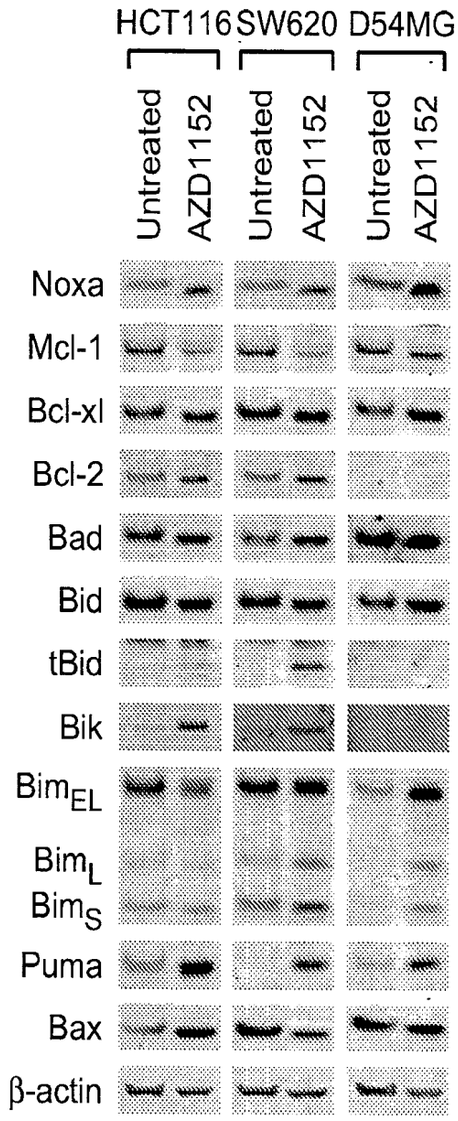


FIG.11C

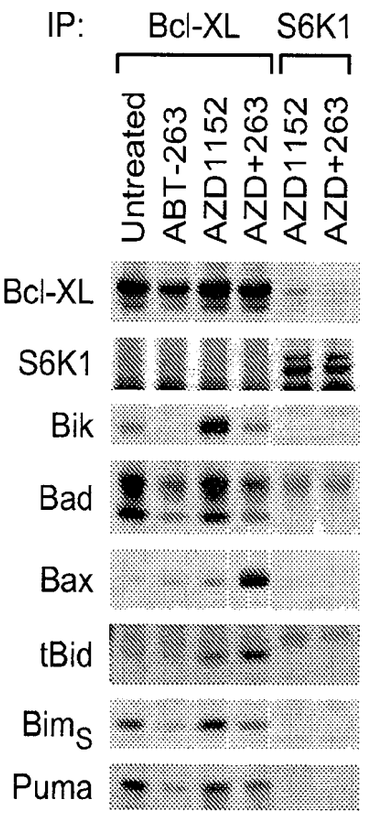


FIG.11D

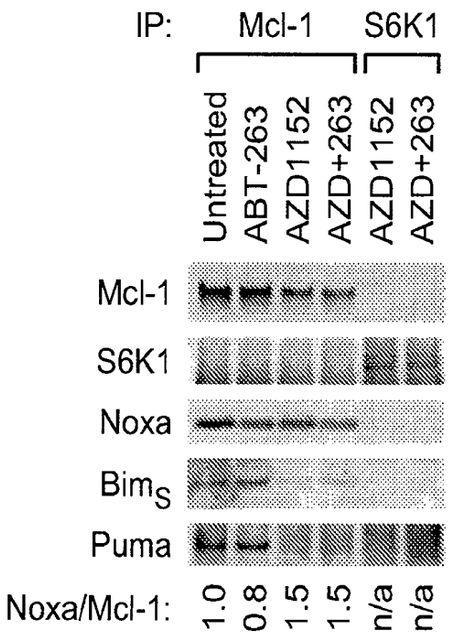


FIG.11E

AZD1152+DMSO
AZD1152+ABT-263
Viability (% Control)
125
100
75
50
25
0
siLuciferase
siNontarget
siBik-1
siBik-3
siNoxa-1
siNoxa-3
siNoxa-4
siBax-1
siBax-2
siBax-3
siBax-4
siBax-1
siBax-2
siBax-3
siPuma-1
siPuma-3
siPuma-4
siBid-1
siBid-2
siBid-3
siBad-1
siBad-2
siBad-3
siBad-4
siBim-1
siBim-4

FIG.12A

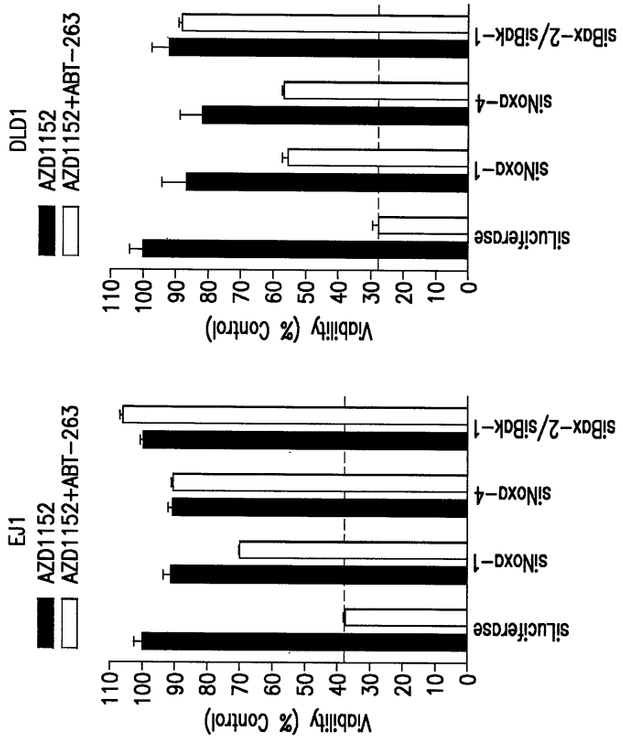

EJ1
AZD1152
AZD1152+ABT-263
Viability (% Control)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
siLuciferase
siNoxa-1
siNoxa-4
siBax-2/siBak-1
DLD1
AZD1152
AZD1152+ABT-263
Viability (% Control)
siLuciferase
siNoxa-1
siNoxa-4
siBax-2/siBak-1

FIG. 12B

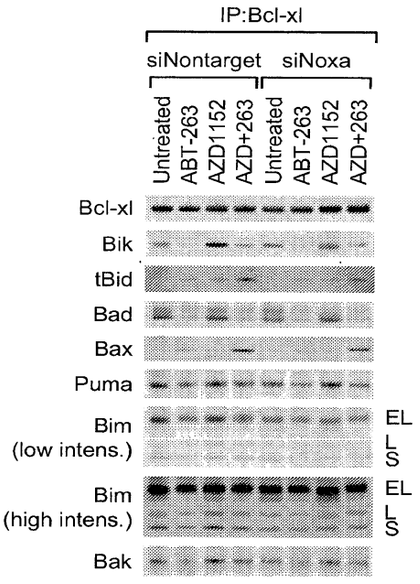


FIG.12C

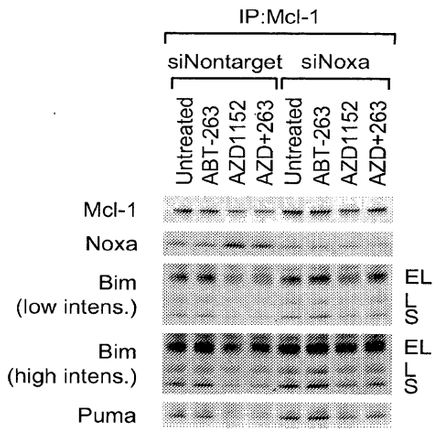


FIG.12D

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

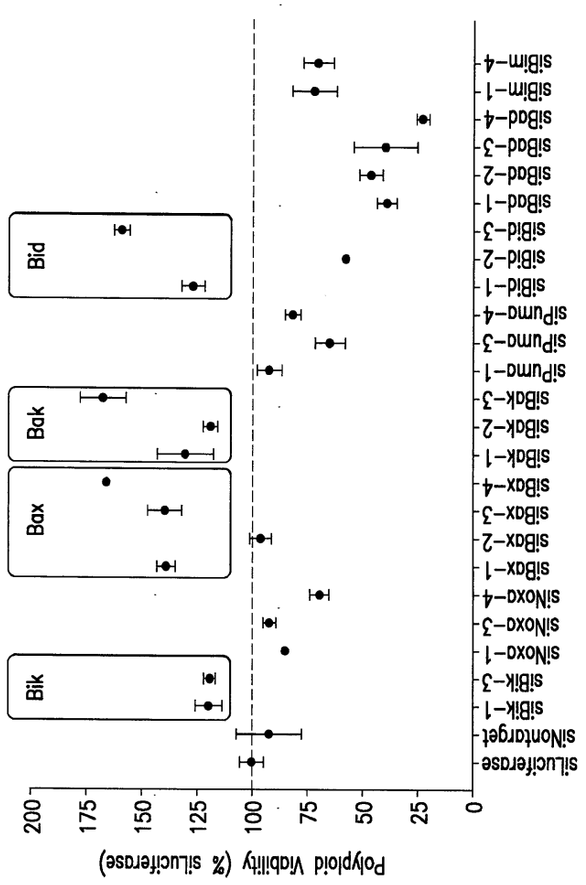

Polyploid Viability (% siLuciferase)
200
175
150
125
100
75
50
25
0
Bik
Bax
Bak
Bid
siLuciferase
siNontarget
siBik–1
siBik–3
siNoxa–1
siNoxa–3
siNoxa–4
siBax–1
siBax–2
siBax–3
siBax–4
siBak–1
siBak–2
siBak–3
siPuma–1
siPuma–3
siPuma–4
siBid–1
siBid–2
siBid–3
siBad–1
siBad–2
siBad–3
siBad–4
siBim–1
siBim–4

FIG. 12E

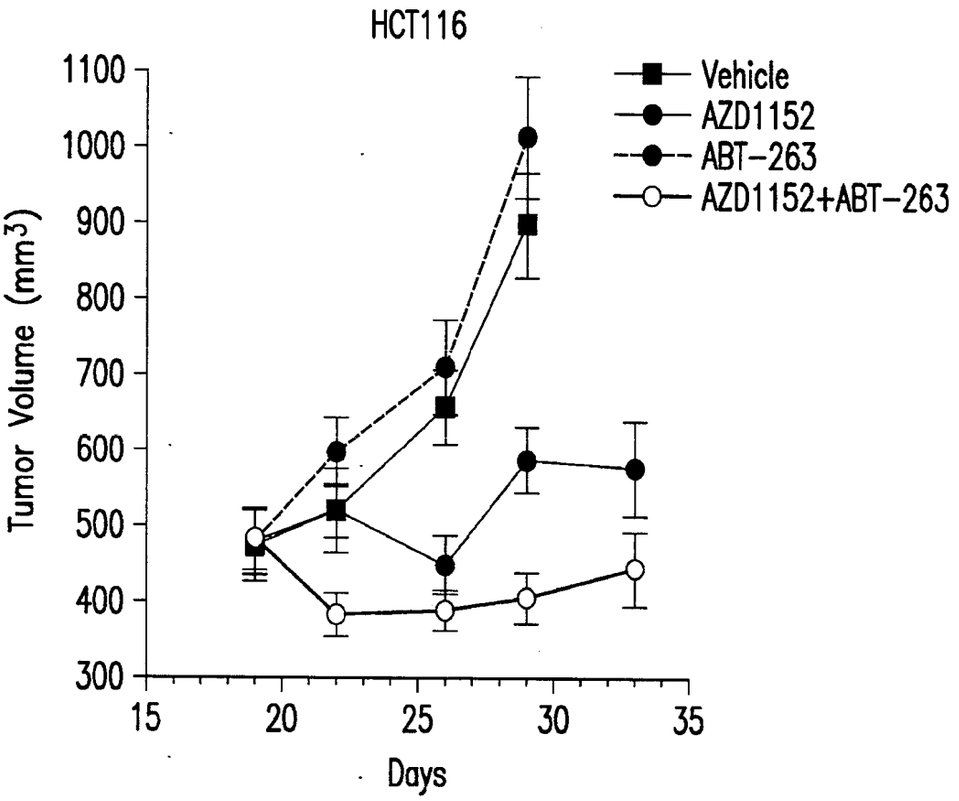


FIG.13A

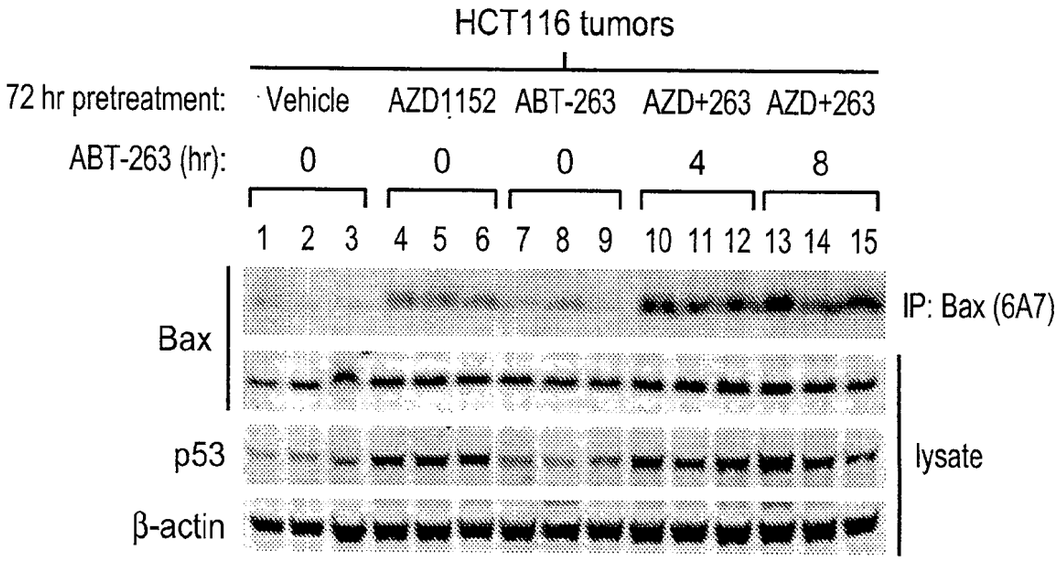


FIG.13B

FIG.13C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

D54MG
SW620
EJ1
AZD + 263
Unt 263 AZD 263
IP:Bak (Ab2)
Lysate
IP:Bax (6A7)
Lysate
WB: Bak
WB: Bax

FIG.14

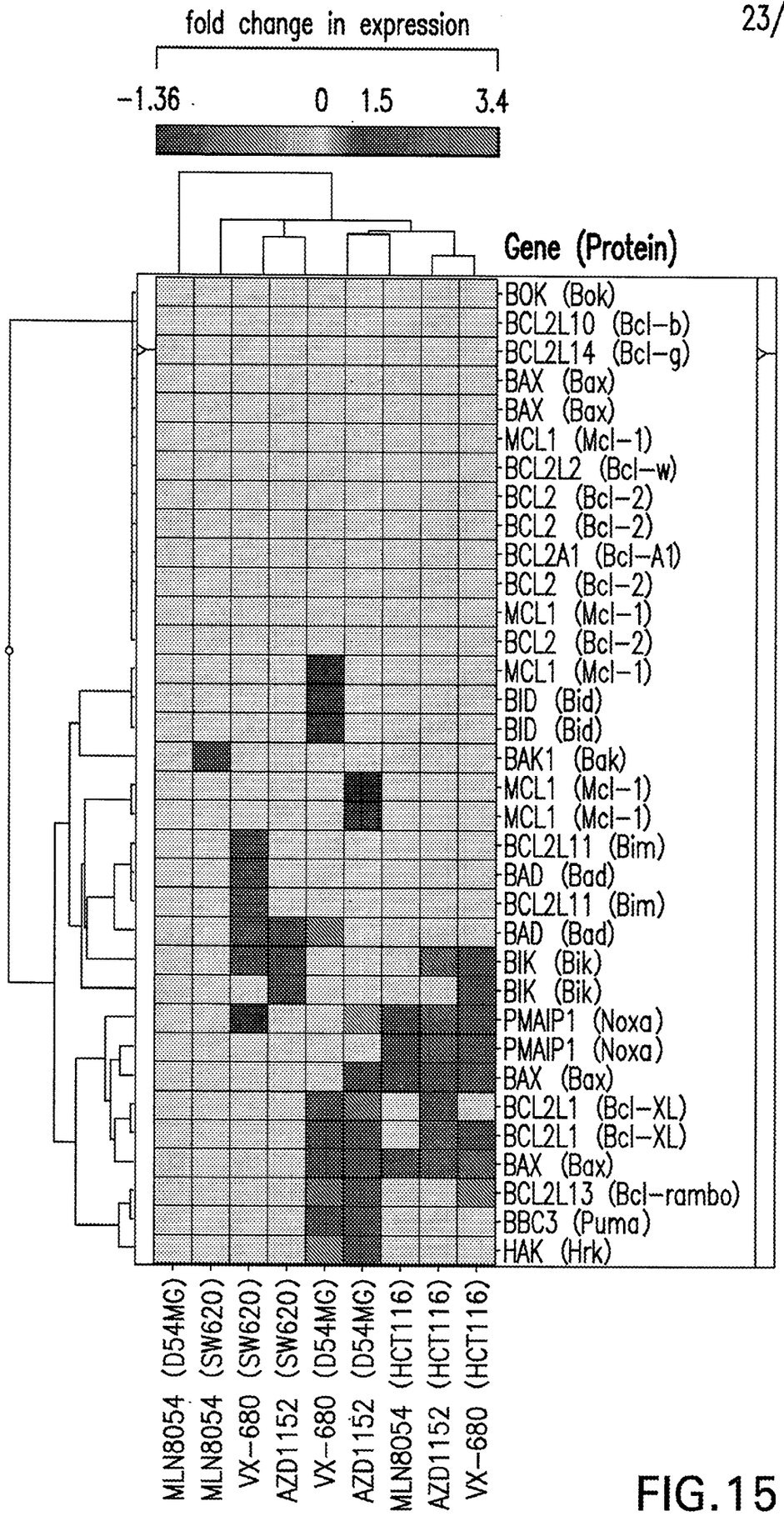

fold change in expression
-1.36
0
1.5
3.4
Gene (Protein)
BOK (Bok)
BCL2L10 (Bcl-b)
BCL2L14 (Bcl-g)
BAX (Bax)
BAX (Bax)
MCL1 (Mcl-1)
BCL2L2 (Bcl-w)
BCL2 (Bcl-2)
BCL2 (Bcl-2)
BCL2A1 (Bcl-A1)
BCL2 (Bcl-2)
MCL1 (Mcl-1)
BCL2 (Bcl-2)
MCL1 (Mcl-1)
BID (Bid)
BID (Bid)
BAK1 (Bak)
MCL1 (Mcl-1)
MCL1 (Mcl-1)
BCL2L11 (Bim)
BAD (Bad)
BCL2L11 (Bim)
BAD (Bad)
BIK (Bik)
BIK (Bik)
PMAIP1 (Noxa)
PMAIP1 (Noxa)
BAX (Bax)
BCL2L1 (Bcl-XL)
BCL2L1 (Bcl-XL)
BAX (Bax)
BCL2L13 (Bcl-rambo)
BBC3 (Puma)
HAK (Hrk)
MLN8054 (D54MG)
MLN8054 (SW620)
VX-680 (SW620)
AZD1152 (SW620)
VX-680 (D54MG)
AZD1152 (D54MG)
MLN8054 (HCT116)
AZD1152 (HCT116)
VX-680 (HCT116)

FIG.15

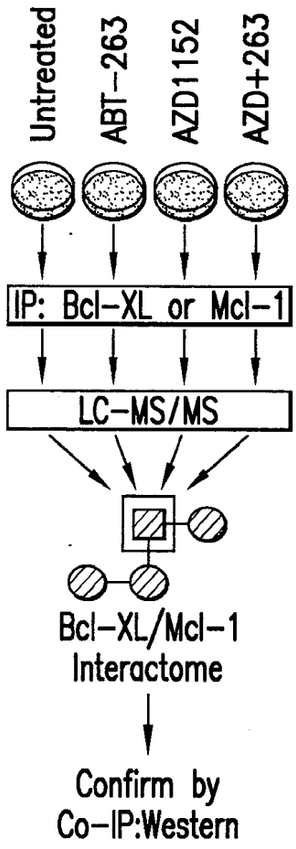

Untreated
ABT-263
AZD1152
AZD+263
IP: Bcl-XL or Mcl-1
LC-MS/MS
Bcl-XL/Mcl-1
Interactome
Confirm by
Co-IP:Western

FIG.16A

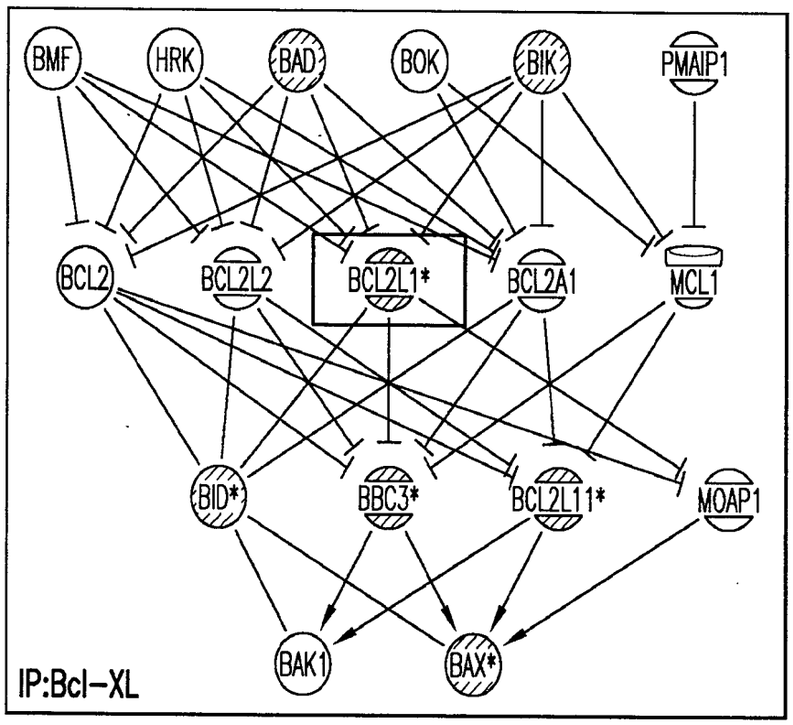


FIG.16B

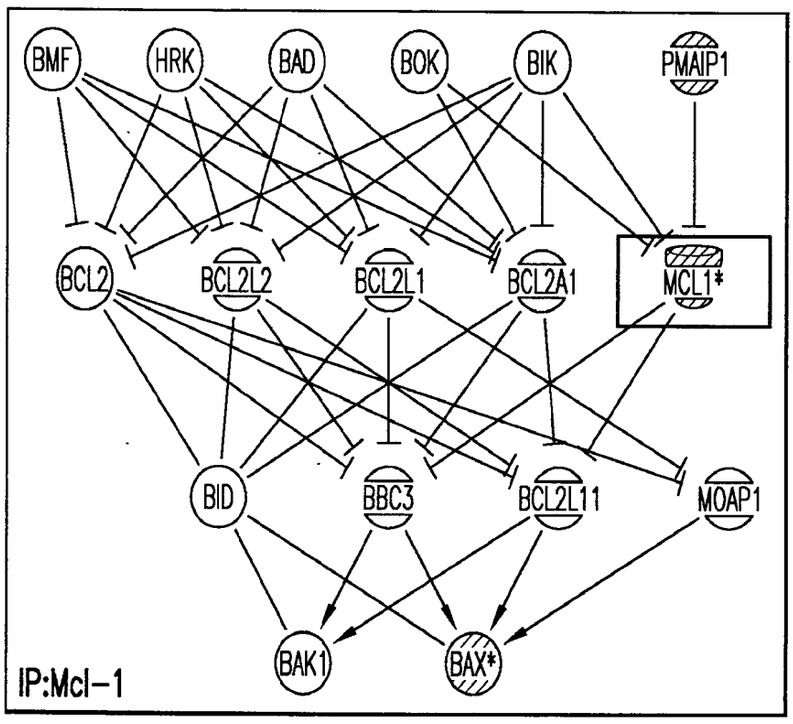


FIG.16C

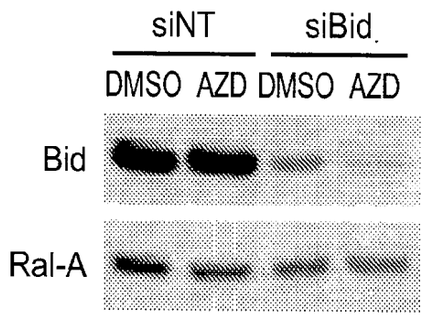


FIG.17A

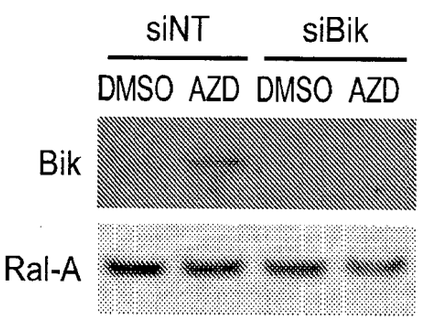


FIG.17B

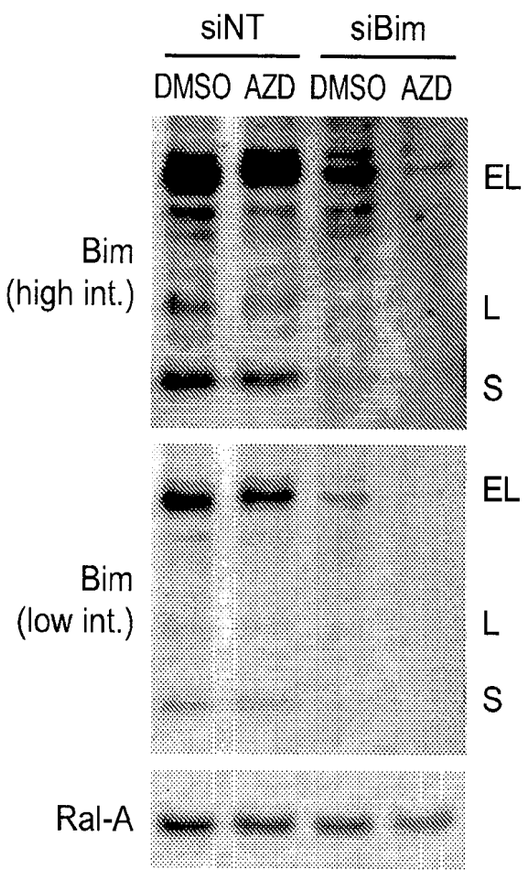


FIG.17C

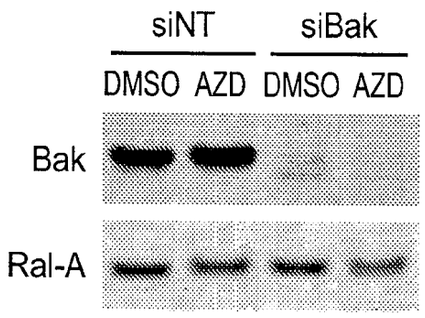


FIG.17D

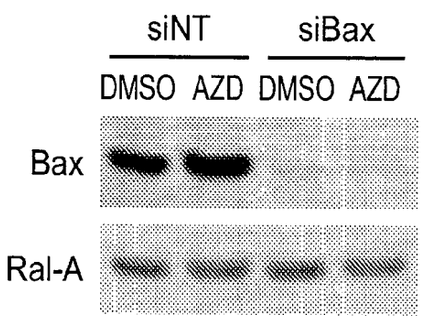


FIG.17E

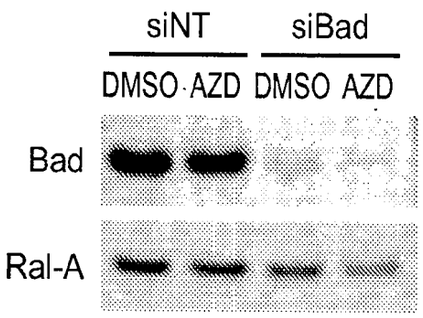


FIG.17F

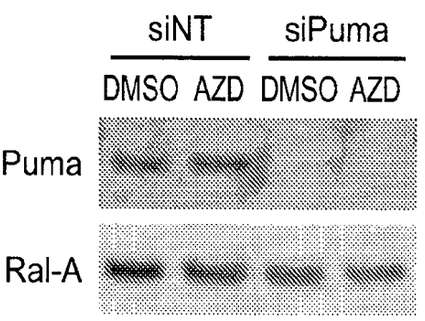


FIG.17G

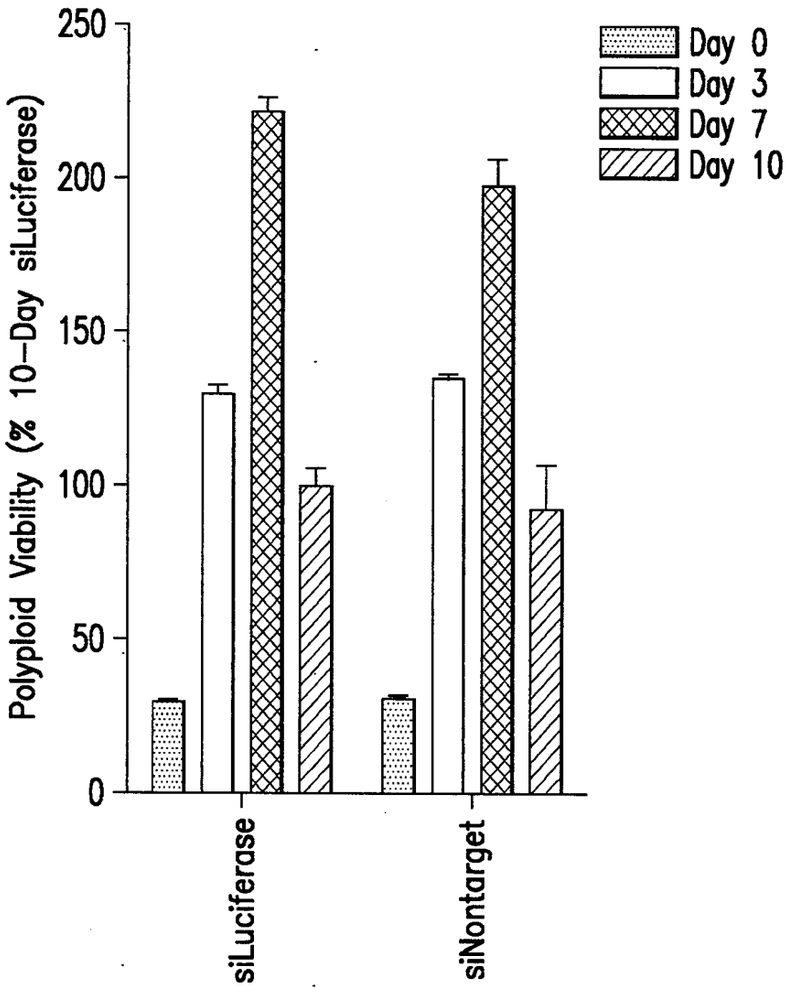

Polyploid Viability (% 10-Day siLuciferase)
250
200
150
100
50
0
Day 0
Day 3
Day 7
Day 10
siLuciferase
siNontarget

FIG.18

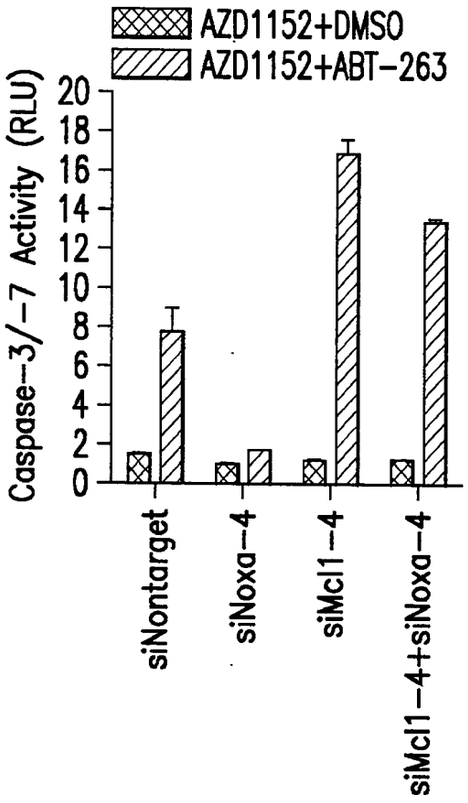


FIG.19A

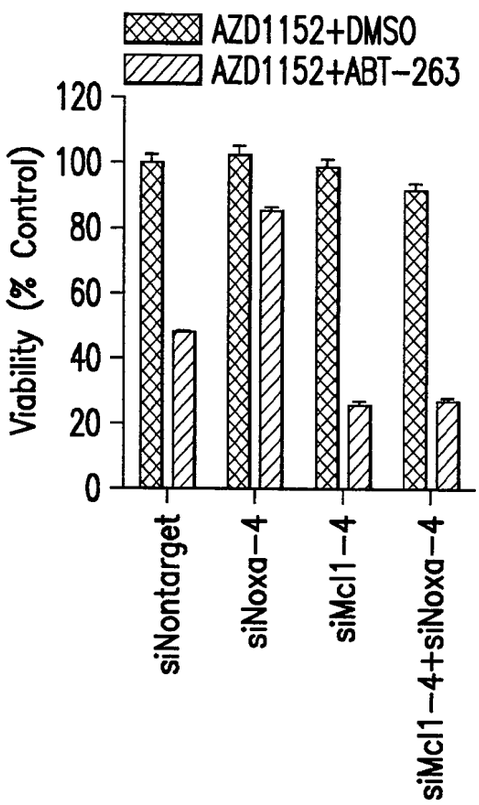


FIG.19B

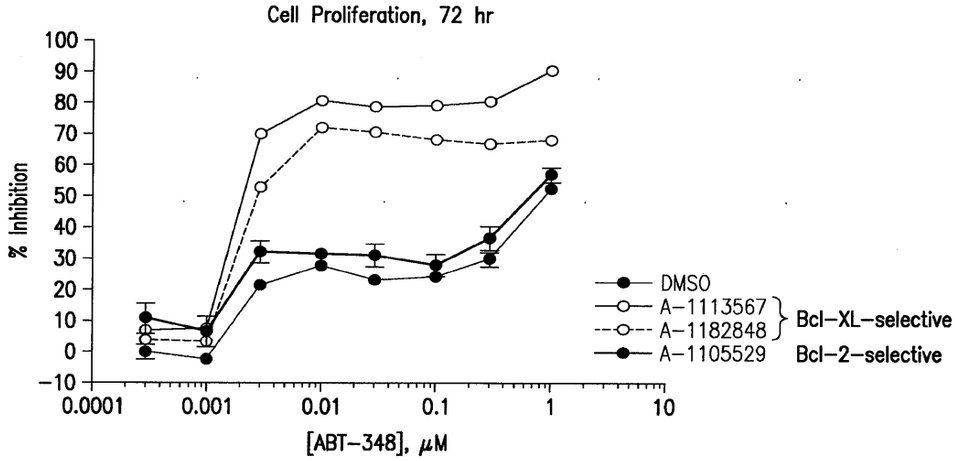


FIG.20

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/058549

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K31/454 A61K31/506 A61K31/5377 A61K31/635 A61K31/675
A61K45/06 A61P35/00 G01N33/48 C12Q1/68
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/040650 A2 (ABBOTT LAB [US]; BRUNCKO MILAN [US]; DING HONG [US]; ELMORE STEVEN W [] 12 April 2007 (2007-04-12) page 2, line 1 - page 5, line 6 page 8, line 26 - page 13, line 15 page 17, line 1 - line 4 page 17, line 33 - line 34 page 22, line 20 - line 28; claims; examples page 27, line 1 - line 7; table 2 -----	1-10
X	US 2007/072860 A1 (BRUNCKO MILAN [US] ET AL) 29 March 2007 (2007-03-29) page 52, paragraph 855 - page 53, paragraph 863 page 57, paragraph 883 page 57, paragraph 889; claims -----	1-10

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 April 2011	03/05/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Nurmi, Jussi

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/058549

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. (means)

   - [ ] on paper
   - [X] in electronic form

   b. (time)

   - [X] in the international application as filed
   - [ ] together with the international application in electronic form
   - [ ] subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/058549

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2010/ 058549

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-10

   Combination of therapeutic agents for use in treating cancer, wherein said combination comprises a) at least one polyploidy inducing agent and b) at least one Bcl-2 family protein inhibitor

   ---

2. claims: 11-52

   A method of classifying a patient for eligibility for treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination thereof; a method of monitoring a patient suffering from cancer and being treated with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination thereof; a method of classifying a patient as having a cancer that is resistant to treatment with a polyploidy inducing agent, a Bcl-2 family protein inhibitor or a combination thereof

   ---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/058549

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/141145 A1 (ABBOTT LAB [US]; MICHAELIDES MICHAEL R [US]; ZHIQIN JI [US]) 20 November 2008 (2008-11-20) page 1, line 5 - line 12 page 16, line 21 - line 24 page 18, line 9 - line 12 page 18, line 39 - page 19, line 4	1-3,5-8, 10
X	SHOEMAKER ALEX R ET AL: "The Bcl-2 family inhibitor ABT-263 shows significant anti-tumor efficacy in models of B cell Non-Hodgkin's lymphoma", BLOOD, vol. 108, no. 11 part 1, 16 November 2006 (2006-11-16), pages 1-2, XP008132892, 48TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; ORLANDO,FL, USA ISSN: 0006-4971 the whole document	1,5,6,10
X	TSE CHRISTIN ET AL: "ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor.", CANCER RESEARCH, vol. 68, no. 9, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 3421-3428, XP002631072, ISSN: 1538-7445 the whole document page 3424, column 2, paragraph 3-5	1,5,6, 10-52
X	-& TSE CHRISTIN ET AL: "Supplemental Material and Methods:ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor.", CANCER RESEARCH, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 1-18, XP002633660, ISSN: 1538-7445 Supplementary figure S4, figure legend	1,5,6, 10-52

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/058549

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MASON K D ET AL: "The BH3 mimetic compound, ABT-737, synergizes with a range of cytotoxic chemotherapy agents in chronic lymphocytic leukemia.", LEUKEMIA : OFFICIAL JOURNAL OF THE LEUKEMIA SOCIETY OF AMERICA, vol. 23, no. 11, November 2009 (2009-11), pages 2034-2041, XP002621450, LEUKEMIA RESEARCH FUND, U.K ISSN: 1476-5551 whole document and more particularly page 2037, right-hand column, last paragraph to page 2039, left-hand column, paragraph 1; Figure 3 and Table 2; abstract	1,5,6, 10-52
X	KANG MIN H ET AL: "Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy.", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 15, no. 4, 15 February 2009 (2009-02-15), pages 1126-1132, XP002621451, ISSN: 1078-0432 whole document and more particularly page 1129, right-hand column, paragraph 2 to page 1130, right-hand column, last paragraph	1,5,6,10
X	PAN CAOBING ET AL: "Aurora kinase small molecule inhibitor destroys mitotic spindle, suppresses cell growth, and induces apoptosis in oral squamous cancer cells.", ORAL ONCOLOGY, vol. 44, no. 7, July 2008 (2008-07), pages 639-645, XP22763322, ISSN: 1368-8375 the whole document	1-4,6-9
X	ZONG ZHI-PING ET AL: "Phorbol myristate induces apoptosis of taxol-resistant sarcoma cells in vitro.", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 489, no. 1-2, 5 April 2004 (2004-04-05), pages 3-11, XP002621453, ISSN: 0014-2999 the whole document	1,6

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/058549

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HARRINGTON E A ET AL: "VX-680, a potent and selective small molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo", NATURE MEDICINE, vol. 10, no. 3, 1 March 2004 (2004-03-01), pages 262-267, XP002490468, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/NM1003 the whole document	1-10
A	WILKINSON ROBERT W ET AL: "AZD1152, a selective inhibitor of Aurora B kinase, inhibits human tumor xenograft growth by inducing apoptosis.", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 13, no. 12, 15 June 2007 (2007-06-15) , pages 3682-3688, XP002621454, ISSN: 1078-0432 the whole document	1-10
X	WO 2008/082643 A2 (ABBOTT LAB [US]; MURRAY WILLIAM E [US]) 10 July 2008 (2008-07-10) page 7, lines 26-32 page 8, lines 7-20 page 33, lines 8-25; claims 1-7,13-19	11-52
X	WEBER A ET AL: "Endogenous Noxa determines the strong proapoptotic synergism of the BH3-mimetic ABT-737 with chemotherapeutic agents in human melanoma cells", TRANSLATIONAL ONCOLOGY, vol. 2, no. 2, June 2009 (2009-06), pages 73-83, 5PP, XP002631074, EDITORIAL OFFICE USA ISSN: 1936-5233, DOI: 10.1593/TLO.08223 abstract	11-52
X	KAESTNER PHILLIP ET AL: "Determinants for the efficiency of anticancer drugs targeting either Aurora-A or Aurora-B kinases in human colon carcinoma cells", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 8, no. 7, July 2009 (2009-07), pages 2046-2056, XP002631075, ISSN: 1535-7163 page 2053, column 2 - page 2054, column 1, paragraph 1; figure 6 page 2055, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 1	11-52

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/058549

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI M ET AL: "Inducing apoptosis in colorectal tumor cells through inhibition of Aurora B kinase", EJC SUPPLEMENTS, vol. 5, no. 4, September 2007 (2007-09), page 59, XP022332806, & 14TH EUROPEAN CANCER CONFERENCE (ECCO 14); BARCELONA, SPAIN ISSN: 1359-6349 abstract	11-52
X	Li Minglun et al.: "Aurora kinase inhibitor ZM447439 induces apoptosis via mitochondrial pathways", Biochemical Pharmacology, vol. 79, no. 2 15 August 2009 (2009-08-15), XP002631076, Retrieved from the Internet: URL:http://www.sciencedirect.com [retrieved on 2011-04-01] abstract	11-52
X	WO 2007/038406 A1 (UNIV FLORIDA [US]; COGLE CHRISTOPHER RAMIN [US]; MAY WILLIAM STRATFORD) 5 April 2007 (2007-04-05) claims 1-4	11-52
X	DE 199 22 052 A1 (THERAGEN MOLEKULARMEDIZINISCHE [DE]) 16 November 2000 (2000-11-16) claims 1,2,6; table 1	11-52
X	STOETZER O J ET AL: "ASSOCIATION OF BCL-2, BAX, BCL-XL AND INTERLEUKIN-1BETA-CONVERTING ENZYME EXPRESSION WITH INITIAL RESPONSE TO CHEMOTHERAPY IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA", LEUKEMIA, vol. 10, no. SUPPL. 03, 1 July 1996 (1996-07-01), pages S18-S22, XP001053401, MACMILLAN PRESS LTD, US ISSN: 0887-6924 abstract page S19, column 1, paragraph 2; table 2	11-52

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/058549

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCCURRACH MILA E ET AL: "Bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES (PNAS), vol. 94, no. 6, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 2345-2349, XP002161053, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, US ISSN: 0027-8424, DOI: DOI:10.1073/PNAS.94.6.2345 abstract; figure 1B	11-52
X	CHRESTA CHRISTINE M ET AL: "Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio", CANCER RESEARCH, vol. 56, no. 8, 1996, pages 1834-1841, XP002631077, ISSN: 0008-5472 abstract	11-52
X,P	SHAH O JAMEEL ET AL: "Bcl-XL represents a druggable molecular vulnerability during aurora B inhibitor-mediated polyploidization.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 107, no. 28, 13 July 2010 (2010-07-13), pages 12634-12639, XP002621448, ISSN: 1091-6490 the whole document	1-52

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2010/058549

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007040650 A2	12-04-2007	AU 2006297853 A1	12-04-2007
		AU 2010233055 A1	04-11-2010
		BR PI0610108 A2	25-05-2010
		CA 2606147 A1	12-04-2007
		CN 101175738 A	07-05-2008
		CN 101928264 A	29-12-2010
		EP 1888550 A2	20-02-2008
		JP 2008540577 T	20-11-2008
		KR 20080011695 A	05-02-2008
		NZ 561609 A	26-03-2010
		NZ 583758 A	25-02-2011
		US 2008287419 A1	20-11-2008
		US 2007027135 A1	01-02-2007
		US 2010249133 A1	30-09-2010
US 2007072860 A1	29-03-2007	NONE	
WO 2008141145 A1	20-11-2008	CA 2685351 A1	20-11-2008
		CN 101730700 A	09-06-2010
		EP 2150553 A1	10-02-2010
		JP 2010526833 T	05-08-2010
WO 2008082643 A2	10-07-2008	WO 2008082673 A2	10-07-2008
WO 2007038406 A1	05-04-2007	WO 2007038579 A1	05-04-2007
DE 19922052 A1	16-11-2000	AU 5672000 A	05-12-2000
		WO 0070085 A2	23-11-2000
		EP 1181394 A2	27-02-2002

TERAPIA COMBINADA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER Y ENSAYOS DE DIAGNÓSTICO RELACIONADOS

Esta solicitud es una continuación parcial del Acta de los EE.UU. Nº 12/120.914, presentada el 15 de mayo del 2008, que es una solicitud divisional del Acta de los EE.UU. Nº 11/432.937, presentada el 12 de mayo del 2006, ahora Patente de los EE.UU. 7.390.799, que invoca prioridad a la Solicitud Provisional de los EE.UU. Nº de Acta 60/718.618, del 20 de septiembre del 2005 y la Solicitud Provisional de los EE.UU. Nº de Acta 60/680.107, del 12 de mayo del 2005.

CAMPO

La presente divulgación se relaciona con una combinación de agentes terapéuticos para usar en el tratamiento de un paciente que sufre de cáncer. La combinación comprende (1) al menos un agente inductor de poliploidía; y (b) al menos un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2. Adicionalmente, la presente divulgación también se relaciona con ensayos diagnósticos útiles en la clasificación de pacientes para el tratamiento con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2. En particular, la presente divulgación se relaciona con la identificación de la presencia o ausencia de al menos una mutación en un gen BAX, un gen BAK o un gen NOXA y luego clasificar los pacientes como elegibles para recibir tratamiento con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2.

ANTECEDENTES

Los miembros de las proteínas de la familia antiapoptóticas Bcl-2 están

asociados con un número de enfermedades y por lo tanto están bajo investigación como potenciales blancos de drogas terapéuticas. Estos blancos importantes para la terapia intervencionista incluyen, por ejemplo, la familia Bcl-2 de proteínas Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w. Recientemente se han reportado inhibidores de los miembros de la familia Bcl-2 en la literatura, véase, por ejemplo, WO 2005/049594, Oltersdorf, et. al., *Nature*, 435:677-681 (2005), US 6.720.338 y US 7.030.115. Si bien este arte muestra inhibidores que tienen alta unión a la proteína blanco, éste es el único compuesto de muchos parámetros que debe ser considerado un compuesto investigado para el desarrollo de drogas adicional o continuado. Como parte de este desarrollo, es altamente deseable producir compuestos que sean eficaces en modelos animales de cáncer luego de administración oral. Para lograr esta eficacia oral, es bien conocido en el arte que un compuesto no sólo debe mostrar actividad potencial contra un tipo de tumor o línea celular bajo investigación, pero también debe alcanzar niveles aceptables de exposición sistémica luego de la administración. Una medida típica de la actividad celular de un compuesto es la concentración que produce un 50% de efecto celular (EC_{50}). Una medida típica de exposición sistémica es el área bajo la curva que resulta de graficar la concentración del compuesto en plasma luego de la administración oral vs. tiempo (AUC). La relación entre estos parámetros (AUC/EC_{50}) es bien conocida en el arte por constituir un parámetro farmacodinámico para predecir la eficacia oral.

En un aspecto, esta divulgación está dirigida a una serie de análogos haloalquilsulfonilarilo para demostrar propiedades mejoradas e inesperadas respecto a la eficacia celular y exposición sistémica luego de la administración oral en animales. Específicamente, los compuestos de esta divulgación mantienen la potente eficacia

celular a la vez que exhiben una adecuada exposición sistémica luego de la administración oral a animales. Esto da como resultado relaciones AUC/EC_{50} significativamente mayores que las de los compuestos que se describen en el arte. En la presente se describen y son evidentes otros aspectos de la divulgación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la antitumorigénesis comparativa del Ejemplo 1, etopósido y combinaciones del mismo en linfoma de células B.

La Figura 2 muestra la antitumorigénesis comparativa del Ejemplo 1, vincristina y combinaciones de la misma en linfoma de células B.

La Figura 3 muestra la antitumorigénesis comparativa del Ejemplo 1, CHOP y combinaciones del mismo en linfoma de células B.

La Figura 4 muestra la antitumorigénesis comparativa del Ejemplo 1, rituximab y combinaciones del mismo en linfoma de células B.

La Figura 5 muestra la antitumorigénesis comparativa del Ejemplo 1, rapamicina y combinaciones de la misma en linfoma de células B.

La Figura 6 muestra la antitumorigénesis comparativa del Ejemplo 1, R-CHOP y combinaciones del mismo en linfoma de células de manto.

La Figura 7 muestra antitumorigénesis comparativa del Ejemplo 1, bortezomib y combinaciones del mismo en linfoma de células de manto.

La Figura 8 muestra que el mimético de BH3 ABT-263 y el inhibidor pan-aurora VX-680 son sinérgicamente letales. La Figura 8A muestra que el VX-680 se tamizó a una dosis única, fija (1 μM) en combinación con otros 19 quimioterapéuticos en dosis-respuesta en 6 puntos en un panel de 7 líneas celulares derivadas de diferentes neoplasias sólidas. La variabilidad celular se determinó 3 días luego de la exposición a

los regímenes combinados. La sinergia o antagonismo de combinaciones de drogas se determinó usando el modelo de aditivismo de Bliss para interacciones droga-droga (véase, Berenbaum, M.C., Cancer Res 35, 269-335 (1981)). El valor en exceso del aditivismo de Bliss para cada dosis se determinó para todas las combinaciones y se define como sigue: >15 = sinérgico, entre 0 y 15 = sin interacción, <-15 = antagónico. Estos valores se expresan en un mapa de calor usando el programa de análisis de datos SPOTFIRE® (TIBCO®) en donde la sinergia se indica en rojo, sin interacción en gris, y el antagonismo en azul. Cada dosis respuesta incluye un punto para VX-680 solo (0 μM compuesto combinado). Estos valores no se pueden aplicar para el análisis Bliss y se excluyeron del mapa de calor. Los compuestos ensayados en combinación se muestran a la derecha. Los blancos/mecanismos de acción de cada uno de estos agentes y las correspondientes dosis respuesta para el tamizaje de combinación se resume en la Tabla A en el Ejemplo 40. La Figura 8B muestra el análisis de Bliss de determinaciones de viabilidad celular para VX-680 en combinación con ABT-263 en dosis-respuesta en células D54MG, HCT116, SW620, A549, PC3, y EJ1. La Figura 8C muestra determinaciones de viabilidad celular analizadas en la Figura. 8B.

La Figura 9 muestra que la inhibición de aurora B y Bcl-X_L es suficiente para la citotoxicidad sinérgica. La Figura 9A muestra células de carcinoma de colon HCT116 no transfectadas o transfectadas con luciferasa, aurora A, ARNpi aurora B respectivamente. Luego de 24 de la transfección, las células se trataron con ABT-263 en dosis respuesta, y se determinó la viabilidad celular 72 horas luego de la adición de ABT-263. La Figura 8B muestra inmunotransferencias de lisados de HCT116 que demuestran el silenciamiento de proteínas blanco 72 luego de la transfección con ARNpi usados en la Figura 9A. Se ensayaron MLN8054 (Figura 9C) o AZD1152

(Figura 9D) en combinación con DMSO o ABT-263 1 μM en células HCT116. Se determinó la viabilidad celular 72 horas luego del tratamiento. La Figura 8E muestra inmunotransferencias de lisados de HCT116 que demuestran el silenciamiento de Bcl-2, Bcl-X_L, y Mcl-1 72 horas luego de la transfección. El EJ1 (Figura 9F) o las células HCT116 (Figura 9G) se transfectaron con un ARNpi para luciferasa o el mismo conjunto de ARNpi contra Bcl-2, Bcl-X_L, o ARNpi Mcl-1 como en la Figura 9E. 24 horas luego de la transfección, las células se trataron con diferentes cantidades de AZD1152. La viabilidad celular se determinó 72 horas luego de la exposición a AZD1152. La Figura 9H muestra que las células HCT116 se transfectaron con diferentes cantidades de ARNpi contra aurora B o Bcl-X_L individualmente o en combinación. La viabilidad celular se determinó 72 horas luego de la transfección. En todas las figuras, la viabilidad celular se expresó como el porcentaje de células control no transfectadas, tratadas con DMSO. La curva de viabilidad roja representa una combinación sinérgica.

La Figura 10 muestra que la poliploidización produce células dependientes de Bcl-X_L. La Figura 10A muestra que las células HCT116 se transfectaron con ARNpi contra INCENP o Bcl-X_L en dosis-respuesta individualmente o en combinación. La viabilidad celular se determinó 72 horas luego de la transfección. La curva roja representa una combinación sinérgica. La Figura 10B muestra inmunotransferencias de lisados de HCT116 que demuestran el silenciamiento de INCENP 72 horas luego de la transfección con el mismo ARNpi que en la Figura 10A. Las células HCT116 (Figura 10C-Figura 10F) se trataron durante 24 horas con DMSO o AZD1152 200 nM. Luego el AZD1152 se dejó en el medio de cultivo (AZD1152) o se lavó por reemplazo del medio con medio de crecimiento libre de droga (AZD1152 lavado). Las células se

cultivaron durante 72 horas adicionales antes de ser sometidas al siguiente tratamiento/análisis: análisis por Western (Figura 10C) para determinar las cantidades de p53, histona H3 fosforilada ($pSer^{10}$) y no fosforilada, u obtención de imágenes por contraste de fase (Figura 10D) para mostrar signos morfológicos de poliploidía, tal como tamaño celular dramáticamente aumentado y multinucleación, en células AZD1152 tratadas sin importar del lavado, tratamiento adicional con ABT-263 1 µM durante 4 horas (Figura 10E) y ensayo para actividad de Caspasa-3, y tratamiento adicional con ABT-263 1 µM (Figura 10F) durante 24 horas y ensayo de viabilidad celular.

La Figura 11 muestra la modulación de la red de Bcl-2 durante la poliploidización. Las células HCT116 (Figura 11A) se trataron con DMSO o AZD1152 200 nM durante 72 horas seguido por 2 horas con ABT-263 1 µM. Se inmunoprecipitó BAK o BAX conformacionalmente activa y se detectó por inmunotransferencia. Las células D54MG y HCT116 (Figura 11B) se trataron con DMSO o AZD1152 200 nM durante 72 horas antes del agregado de ABT-263 1 µM durante 4 horas. Se inmunoprecipitó BAK o BAX conformacionalmente activa y se detectó por inmunotransferencia (panel de arriba y central). Los lisados celulares también se fraccionaron y se detectó la liberación de citocromo C a la fracción citosólica por inmunotransferencia. Las células HCT116, SW620, y D54MG (Figura 11C) se trataron con DMSO (sin tratar) o AZD1152 200 nM (AZD1152) durante 72 horas y se detectó la expresión de los componentes de la red de Bcl-2 por inmunotransferencia (Figura 11D - Figura 11E). Las células HCT116 se trataron como en la Figura 11B. Se inmunoprecipitaron Bcl-X_L y Mcl-1 endógenos, y se detectaron los componentes de la red de Bcl-2 en los inmunocomplejos por inmunotransferencia.

La Figura 12 muestra que los elementos de la red de Bcl-2 son requeridos para la "adicción" de Bcl-X_L en células poliploides y para la apoptosis mediada por poliploidización. La Figura 12A muestra que una biblioteca enfocada de ARNpi dirigidos a los componentes de la red de Bcl-2 se transfectó como oligos individuales en células HCT116. Las células EJ1 y DLD1 (Figura 12B) se transfectaron con ARNpi contra NOXA individual o ARNpi contra BAX y BAK en combinación. En la Figura 12A y la Figura 12B, 24 horas luego de la transfección, se trataron las células con AZD1152 200 nM para inducir poliploidía. 72 horas luego del agregado de AZD1152, las células se trataron con ABT-263 1 μM y se determinó la viabilidad celular 24 horas luego del agregado de ABT-263. Las células HCT116 (Figura 12C y Figura 12D) se transfectaron con un ARNpi control, sin blanco o un ARNpi contra NOXA. 24 horas luego de la transfección, las células se trataron con AZD1152 200 nM durante 72 horas. Luego se agregó ABT-263 1 μM durante 2 horas antes de la lisis celular y la inmunoprecipitación de Bcl-X_L o Mcl-1. Las células HCT116 (Figura 12E) se transfectaron con la biblioteca de ARNpi enfocados como en la Figura 12A. 24 horas luego de la transfección, las células se trataron con AZD1152 200 nM para inducir poliplodía. Se lavó el AZD1152 por reemplazo del medio con medio de crecimiento libre de droga 3 y 7 días luego del agregado de AZD1152. La viabilidad celular se determinó 10 días después del agregado de AZD1152 para evaluar la letalidad inducida por poliploidización.

La Figura 13 muestra que ABT-263 y AZD1152 producen inhibición sinérgica del crecimiento tumoral in vivo. La Figura 13A muestra la curva de crecimiento de tumores HCT116 en ratones cuando se administra vehículo, ABT-263, AZD1152, o la combinación de AZD1152 y ABT-263 como se indica en el Ejemplo 40. Los ratones

que portan tumor CT116 (Figura 13B) se trataron con vehículo o AZD1152 (100 mg/kg/día (a partir de aquí "mkd", IP, QD) durante 3 días consecutivos antes de la administración de vehículo o ABT-263 (75 mkd, PO). 4 horas y 8 horas luego de la administración de ABT-263, se colectaron los tumores, y se analizó la abundancia de p53 y el BAX conformacionalmente activo (IP con 6A7, un anticuerpo que detecta específicamente BAX activo, seguido por inmunotransferencia de BAX) de los lisados tumorales. La Figura 13C muestra un modelo de "adicción" de Bcl-X_L y sensibilidad a ABT-263 en células poliploides. La poliploidización neutraliza funcionalmente Mcl-1 por disminución de la expresión de la proteína Mcl-1, induciendo NOXA, aumentando la interacción de NOXA con Mcl-1, o alguna combinación de estos efectos. Adicionalmente, Bcl-X_L se vuelve sobrecargada por proteínas sólo-BH3, tales como tBID y BIK. Esto vuelve a la supervivencia celular cada vez más dependiente de Bcl-X_L. Esta dependencia o "adicción" representa un talón de Aquiles molecular de poliploidización, como ABT-263, que deshabilita la función antiapoptótica de Bcl-X_L, provoca una rápida y robusta apoptosis en células tumorales poliploides.

La Figura 14 muestra la activación de BAK y BAX en líneas celulares tumorales. Las células D54MG, SW620, y EJ1 se trataron como en la Figura 17B. Se inmunoprecipitó BAK y BAX conformacionalmente activos y se detectaron por inmunotransferencia.

La Figura 15 muestra los cambios de expresión de genes en la red de Bcl-2. Las células D54MG, SW620, y HCT116 se trataron durante 72 horas con AZD1152 200 nM, MLN8054 250 nM, o VX-680 1 μM. Estos tratamientos dan como resultado las siguientes selectividades celulares de aurora: aurora B, aurora A, o pan-aurora, respectivamente. Los cambios en la expresión de genes en la red de Bcl-2 se

detectaron por microarreglos. Estos datos se agruparon jerárquicamente usando una medida de similitud por correlación usando el programa de computación para análisis de datos SPOTFIRE® (TIBCO®).

La Figura 16 muestra la identificación del interactoma de Bcl-X_L y Mcl-1.

La Figura 17A muestra un esquema del flujo de trabajo para identificar los interactuantes Bcl-X_L y Mcl-1. Las células HCT116 son no tratadas o tratadas con AZD1152 200 nM, ABT-263 1 μM o la combinación. Se inmunoprecipitaron los Bcl-X_L y Mcl-1 endógenos, y las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron a una digestión tríptica en gel y LC-MS/MS. Las proteínas identificadas de todas las condiciones de tratamiento fueron consolidadas en una lista única como interactomas de Bcl-X_L y Mcl-1 y se aplicaron a un mapa de red de Bcl-2 construido manualmente. Las interacciones se indican en verde. Los componentes del interactoma se confirmaron posteriormente por coinmunoprecipitación e inmunotransferencia (Figura 17B y Figura 17C) Interactomas Bcl-X_L y Mcl-1.

La Figura 18 muestra el noqueo mediado por ARNpi de componentes de la red de Bcl-2. Las células HCT116 se transfectaron con ARNpi como se indica. 24 horas luego de la transfección, las células se trataron con AZD1152 200 nM, y se prepararon lisados 72 horas más tarde y se analizó por inmunotransferencia. Ral-A sirve como control de carga y NTsi, ARNpi control no dirigido.

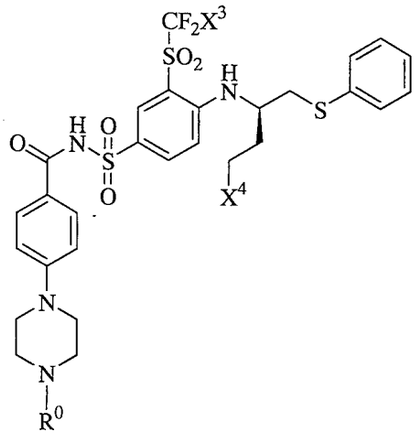
La Figura 19 muestra el curso en el tiempo de la apoptosis mediada por poliploidización. Las células HCT116 se trataron con AZD1152 200 nM, y la viabilidad celular se determinó en el curso en el tiempo indicado.

La Figura 20 muestra que Mcl-1 es epistático para NOXA en la sensibilización de células poliploides para ABT-263. Las células HCT116 (Figura 20A) se

transfectaron como ARNpi como se indicó. 24 horas luego de la transfección, las células se trataron con AZD1152 200 nM durante 72 horas adicionales. Las células luego se trataron durante 4 horas con ABT-263 1 μM, y se determinó la actividad de Caspasa-3. Las células HCT116 (Figura 20B) se transfectaron con ARNpi como se indica. 24 horas luego de la transfección, las células se trataron con AZD1152 200 nM durante 72 horas adicionales. Las células luego se trataron durante 24 horas con ABT-263 1 μM, y se determinó la viabilidad celular.

RESUMEN

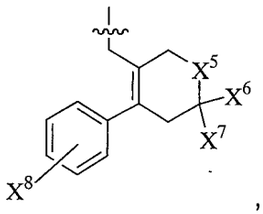
En un aspecto, el presente documento comprende compuestos de fórmula (II)



(II),

y sales terapéuticamente aceptables, prodrogas, sales de prodrogas y metabolitos de los mismos, donde X^3 es Cl o F;

X^4 es azepan-1-ilo, morfolin-1-ilo, 1,4-oxazepan-4-ilo, pirrolidin-1-ilo, $N(CH_3)_2$, $N(CH_3)(CH(CH_3)_2)$, 7-azabiciclo[2,2,1]heptan-1-ilo o 2-oxa-5-azabiciclo[2,2,1]hept-5-ilo, y R^0 es



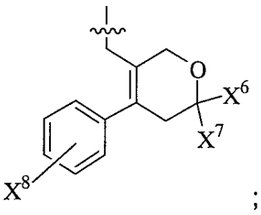
, donde

X^5 es CH_2, $C(CH_3)_2$ o CH_2CH_2;

X^6 y X^7 son ambos hidrógeno o son ambos metilo; y

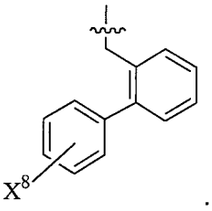
X^8 es F, Cl, Br o I; o

X^4 es azepan-1-ilo, morfolin-1-ilo, pirrolidin-1-ilo, $N(CH_3)(CH(CH_3)_2)$ o 7-azabiciclo[2,2,1]heptan-1-ilo, y R^0 es



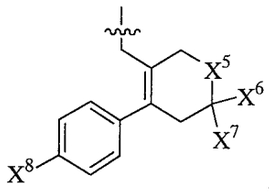
; o

X^4 es $N(CH_3)_2$ o morfolin-1-ilo, y R^0 es



Otro aspecto comprende compuestos de fórmula (II), y sales terapéuticamente aceptables, prodrogas, sales de prodrogas y metabolitos de los mismos, donde X^3 es Cl o F;

X^4 es azepan-1-ilo, morfolin-1-ilo, 1,4-oxazepan-4-ilo, pirrolidin-1-ilo, $N(CH_3)_2$, $N(CH_3)(CH(CH_3)_2)$, 7-azabiciclo[2,2,1]heptan-1-ilo o 2-oxa-5-azabiciclo[2,2,1]hept-5-ilo, y R^0 es



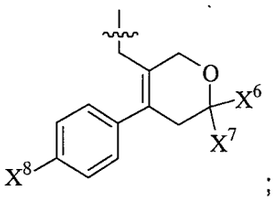
, donde

X^5 es CH_2, $C(CH_3)_2$ o CH_2CH_2;

X^6 y X^7 son ambos hidrógeno o son ambos metilo; y

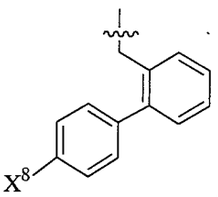
X^8 es F, Cl, Br o I; o

X^4 es azepan-1-ilo, morfolin-1-ilo, pirrolidin-1-ilo, $N(CH_3)(CH(CH_3)_2)$ o 7-azabiciclo[2,2,1]heptan-1-ilo, y R^0 es



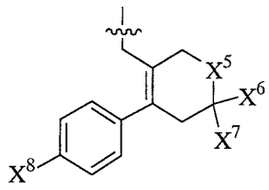
; o

X^4 es $N(CH_3)_2$ o morfolin-1-ilo, y R^0 es



Aun otro aspecto comprende compuestos de fórmula (II), y sales terapéuticamente aceptables, prodrogas, sales de prodrogas y metabolitos de los mismos, donde X^3 es Cl o F;

X^4 es azepan-1-ilo, morfolin-1-ilo, 1,4-oxazepan-4-ilo, pirrolidin-1-ilo, $N(CH_3)_2$, $N(CH_3)(CH(CH_3)_2)$, 7-azabiciclo[2,2,1]heptan-1-ilo o 2-oxa-5-azabiciclo[2,2,1]hept-5-ilo, y R^0 es



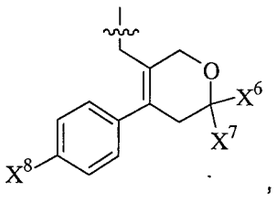
, donde X^5 es CH_2, $C(CH_3)_2$ o CH_2CH_2, y X^6 y X^7 son ambos hidrógeno o son ambos metilo; y

X^8 es F, Cl, Br o I.

Aun otro aspecto comprende compuestos de fórmula (II), y sales terapéuticamente aceptables, prodrogas, sales de prodrogas y metabolitos de los mismos, donde X^3 es Cl o F;

X^4 es azepan-1-ilo, morfolin-1-ilo, pirrolidin-1-ilo, $N(CH_3)(CH(CH_3)_2)$ o 7-azabiciclo[2,2,1]heptan-1-ilo;

R^0 es



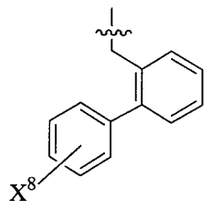
, donde X^6 y X^7 son ambos hidrógeno o son ambos metilo; y

X^8 es F, Cl, Br o I.

Aun otro aspecto comprende compuestos de fórmula (II), y sales terapéuticamente aceptables, prodrogas, sales de prodrogas y metabolitos de los mismos, donde X^3 es Cl o F;

X^4 es $N(CH_3)_2$ o morfolin-1-ilo;

R^0 es

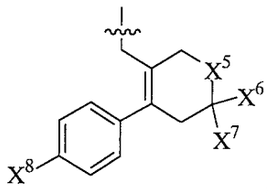


; y

X^8 es F, Cl, Br o I.

Aun otro aspecto comprende un compuesto de fórmula (II), y sales terapéuticamente aceptables, prodrogas, sales de prodrogas y metabolitos de los mismos, donde X^3 es F; X^4 es morfolin-1-ilo;

R^0 es



, donde X^5 es $C(CH_3)_2$; X^6 y X^7 son ambos metilo; y

X^8 es Cl.

Aun otro aspecto comprende

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-5,5-dimetil-1-ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(morfolin-4-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida (llamado en la presente de manera alternativa ABT-263),

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(morfolin-4-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)bencensulfonamida,

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-1-ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(morfolin-4-il)-1-

((fenilsulfanil)metil)propil)amino)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-5;5-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(isopropil(metil)amino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-1-ciclohepten-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(isopropil(metil)amino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-((1S,4S)-2-oxa-5-azabiciclo[2,2,1]hept-5-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(morfolin-4-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

4-(((1R)-3-(7-azabiciclo[2,2,1]hept-7-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(2-oxa-5-azabiciclo[2,2,1]hept-5-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-5,5-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(2-oxa-5-azabiciclo[2,2,1]hept-5-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-5,5-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(2-oxa-5-azabiciclo[2,2,1]hept-5-il)-1-

((fenilsulfanil)metil)propil)amino)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohept-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(2-oxa-5-azabiciclo[2,2,1]hept-5-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohept-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(2-oxa-5-azabiciclo[2,2,1]hept-5-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(isopropil(metil)amino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(1,4-oxazepan-4-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

4-(((1R)-3-(azepan-1-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-1-ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohept-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(dimetilamino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(dimetilamino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)bencensulfonamida,

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-5,5-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(morfolin-4-il)-1-

((fenilsulfanil)metil)propil)amino)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-5,5-dimetil-1-ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(dimetilamino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((4-(4-clorofenil)-5,6-dihidro-2H-piran-3-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(morfolin-4-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(isopropil(metil)amino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)bencensulfonamida,

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-5,5-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(isopropil(metil)amino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(morfolin-4-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-((1S,4S)-2-oxa-5-azabiciclo[2,2,1]hept-5-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(dimetilamino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-1-((fenilsulfanil)metil)-3-(pirrolidin-1-il)propil)amino)-3-

((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(dimetilamino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohept-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-1-((fenilsulfanil)metil)-3-(pirrolidin-1-il)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-5,5-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-1-((fenilsulfanil)metil)-3-(pirrolidin-1-il)propil)amino)bencensulfonamida,

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-1-((fenilsulfanil)metil)-3-(pirrolidin-1-il)propil)amino)bencensulfonamida,

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohept-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-1-((fenilsulfanil)metil)-3-(pirrolidin-1-il)propil)amino)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(isopropil(metil)amino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-1-((fenilsulfanil)metil)-3-(pirrolidin-1-il)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

3-((cloro(difluoro)metil)sulfonil)-N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-1-((fenilsulfanil)metil)-3-(pirrolidin-1-

il)propil)amino)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(dimetilamino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-((1S,4S)-2-oxa-5-azabiciclo[2,2,1]hept-5-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

N-(4-(4-((4'-cloro(1,1'-bifenil)-2-il)metil)-1-piperazinil)benzoil)-4-(((1R)-3-(dimetilamino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida, y

N-(4-(4-((4'-cloro(1,1'-bifenil)-2-il)metil)-1-piperazinil)benzoil)-4-(((1R)-3-(4-morfolinil)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida,

y sales terapéuticamente aceptables, prodrogas, sales de prodrogas y metabolitos de los mismos.

Aún otro aspecto comprende composiciones para tratar enfermedades durante las cuales se expresan una o más de una de la proteína antiapoptótica Bcl-X_L, proteína antiapoptótica Bcl-2 o proteína antiapoptótica Bcl-w, donde dichas composiciones comprenden un excipiente y una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto que tiene la fórmula (II).

Aún otro aspecto comprende métodos para tratar enfermedades en un paciente durante las cuales se expresan una o más de la proteína antiapoptótica Bcl-X_L, proteína antiapoptótica Bcl-2 o proteína antiapoptótica Bcl-w, donde dichos métodos comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de

un compuesto que tiene la fórmula (II).

Aún otro aspecto comprende composiciones que comprenden un excipiente y una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto que tiene la fórmula (II) para tratar enfermedades de crecimiento celular anormal y/o apoptosis desregulada, tal como cáncer, que incluye, por ejemplo, mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o del cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de tubos de falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer de huesos, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal (gástrico, colorrectal y duodenal), leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endócrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer del pene, cáncer de testículo, cáncer hepatocelular (hepático y de ducto biliar), tumor del sistema nervioso central primario o secundario, tumor de cerebro primario o secundario, enfermedad de Hodgkin, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfoma linfocítico, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, malignidades linfoides con origen en células T o células B, melanoma, mieloma múltiple, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de riñón y uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central primario, linfoma no Hodgkin, tumores del eje espinal, glioma de células madre de cerebro, adenoma pituitario, cáncer adrenocortical, cáncer de vesícula biliar, cáncer

de bazo, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, o combinaciones de los mismos.

Aún otro aspecto comprende métodos para tratar mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o del cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de tubos de falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer de huesos, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal (gástrico, colorrectal y duodenal), leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endócrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer del pene, cáncer de testículo, cáncer hepatocelular (hepático y de ducto biliar), tumor del sistema nervioso central primario o secundario, tumor de cerebro primario o secundario, enfermedad de Hodgkin, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfoma linfocítico, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, malignidades linfoides con origen en células T o células B, melanoma, mieloma múltiple, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de riñón y uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central primario, linfoma no Hodgkin, tumores del eje espinal, glioma de células madre de cerebro, adenoma pituitario, cáncer adrenocortical, cáncer de vesícula biliar, cáncer de bazo, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores en un

paciente, donde dichos métodos comprende administrarles una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tiene la fórmula (II).

Aún otro aspecto comprende composiciones para tratar cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de médula ósea, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, formas malignas linfoides originadas de células T o de células B, melanoma, leucemia mielogénica, mieloma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica crónica, mieloma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo, donde dichas composiciones comprenden un excipiente y una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto que tiene fórmula (II).

Aún otro aspecto comprende métodos para tratar cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de médula ósea, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, formas malignas linfoides originadas de células T o de células B, melanoma, leucemia mielogénica, mieloma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica crónica, mieloma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo en un paciente, en donde dichos métodos comprenden administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tiene la fórmula (II).

Aún otro aspecto comprende composiciones para tratar enfermedades en un paciente durante las cuales se expresa una o más de una de proteína antiapoptótica Bcl-X_L, proteína antiapoptótica Bcl-2 o proteína antiapoptótica Bcl-w, donde dichas

composiciones comprenden un excipiente y una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto que tiene la fórmula (II) y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico adicional o más de un agente terapéutico adicional.

Aún otro aspecto comprende métodos para tratar enfermedades en un paciente durante las cuales se expresa una o más de una de proteína antiapoptótica Bcl-X_L, proteína antiapoptótica Bcl-2 o proteína antiapoptótica Bcl-w, en donde dichos métodos comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tiene la fórmula (II) y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico adicional o más de un agente terapéutico adicional.

Aún otro aspecto comprende composiciones para tratar mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o del cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de tubos de falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer de huesos, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal (gástrico, colorrectal y duodenal), leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endócrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer del pene, cáncer de testículo, cáncer hepatocelular (hepático y de ducto biliar), tumor del sistema nervioso central primario o secundario, tumor de cerebro primario o secundario, enfermedad de Hodgkin, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfoma linfocítico, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, malignidades linfoides con origen en células T o células B, melanoma, mieloma múltiple, cáncer

oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de riñón y uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central primario, linfoma no Hodgkin, tumores del eje espinal, glioma de células madre de cerebro, adenoma pituitario, cáncer adrenocortical, cáncer de vesícula biliar, cáncer de bazo, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores, en donde dichas composiciones comprenden un excipiente y una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tiene la fórmula (II) y un agente terapéutico adicional o más de un agente terapéutico adicional.

Aún otro aspecto comprende métodos para tratar mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o del cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de tubos de falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer de huesos, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal (gástrico, colorrectal y duodenal), leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endócrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer del pene, cáncer de testículo, cáncer hepatocelular (hepático y de ducto biliar), tumor del sistema nervioso central primario o secundario, tumor de cerebro primario o secundario, enfermedad de Hodgkin, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfoma linfocítico, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, malignidades

linfoides con origen en células T o células B, melanoma, mieloma múltiple, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de riñón y uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central primario, linfoma no Hodgkin, tumores del eje espinal, glioma de células madre de cerebro, adenoma pituitario, cáncer adrenocortical, cáncer de vesícula biliar, cáncer de bazo, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores en un paciente, en donde dichos métodos comprenden administrarles cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto que tiene la fórmula (II) y un agente terapéutico adicional o más de un agente terapéutico adicional.

Aún otro aspecto comprende métodos para tratar mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o del cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de tubos de falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer de huesos, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal (gástrico, colorrectal y duodenal), leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endócrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer del pene, cáncer de testículo, cáncer hepatocelular (hepático y de ducto biliar), tumor del sistema nervioso central primario o secundario, tumor de cerebro primario o secundario, enfermedad de Hodgkin, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide

crónica, linfoma linfocítico, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, malignidades linfoides con origen en células T o células B, melanoma, mieloma múltiple, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de riñón y uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central primario, linfoma no Hodgkin, tumores del eje espinal, glioma de células madre de cerebro, adenoma pituitario, cáncer adrenocortical, cáncer de vesícula biliar, cáncer de bazo, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores en un paciente, en donde dichos métodos comprenden administrarle cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto que tiene la fórmula (II) y uno o más de uno de etopósido, vincristina, CHOP, rituximab, rapamicina, R-CHOP, bortezomib, MLN8237, tozasertib (también conocido como VX-680 o MK-0457), PHA-739358, AT9283, AZD1152, BI811283, ENMD-2076, CYC116, AMG900, PF-03814735, R763, SNS-314 o TAK-901.

Aún otro aspecto comprende métodos para tratar linfoma de células B en un paciente que comprende administrarle una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tiene la fórmula (II) y etopósido.

Aún otro aspecto comprende métodos para tratar linfoma de células B en un paciente que comprende administrarle cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto que tiene la fórmula (II) y vincristina.

Aún otro aspecto comprende métodos para tratar linfoma de células B en un paciente que comprende administrarle cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto que tiene la fórmula (II) y CHOP.

Aún otro aspecto comprende métodos para tratar linfoma de células B en un paciente que comprende administrarle cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto que tiene la fórmula (II) y rituximab.

Aún otro aspecto comprende métodos para tratar linfoma de células B en un paciente que comprende administrarle cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto que tiene la fórmula (II) y rapamicina.

Aún otro aspecto comprende métodos para tratar linfoma de células de manto en un paciente que comprende administrarle cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto que tiene la fórmula (II) y R-CHOP.

Aún otro aspecto comprende métodos para tratar linfoma de células de manto en un paciente que comprende administrarle cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto que tiene la fórmula (II) y bortezomib.

En aún otro aspecto, la presente divulgación se relaciona con un método para tratar un paciente que sufre de cáncer. El método comprende los pasos de:

a) administrarle al paciente que sufre de cáncer una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente inductor de poliploidía; y

b) administrarle al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2.

En el método anterior, el agente inductor de poliploidía puede ser un inhibidor de aurora quinasa. El inhibidor de aurora quinasa puede ser un inhibidor de aurora quinasa A, un inhibidor de aurora quinasa B, un inhibidor de aurora quinasa C o combinaciones de los mismos. Más específicamente, el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa B. Por ejemplo, el inhibidor de aurora quinasa B es AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 o Hersperadina.

En el método anterior, el inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 puede ser ABT-263, ABT-737, un inhibidor selectivo de Bcl-X_L o combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, la presente divulgación se relaciona con una combinación de agentes terapéuticos para usar en el tratamiento de un paciente que sufre de cáncer. La combinación comprende:

a) al menos un agente inductor de poliploidía para usar en la inducción de poliploidización en una o más células cancerígenas en el paciente; y

b) al menos un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2.

En la combinación anterior, el agente inductor de poliploidía puede ser un inhibidor de aurora quinasa. El inhibidor de aurora quinasa puede ser un inhibidor de aurora quinasa A, un inhibidor de aurora quinasa B, un inhibidor de aurora quinasa C o combinaciones de los mismos. Más específicamente, el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa B. Por ejemplo, el inhibidor de aurora quinasa B es AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 o Hersperadina.

En la combinación anterior, el inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 puede ser ABT-263, ABT-737, un inhibidor selectivo de Bcl-X_L o combinaciones de los mismos.

En aún otro aspecto, la presente divulgación se relaciona con un método para clasificar un paciente según elegibilidad para el tratamiento con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2. El método comprende los pasos de:

a) proveer una muestra para pruebas del paciente;

b) determinar la presencia o ausencia de al menos una mutación en al menos

un gen seleccionado del grupo que consiste en: un gen BAX, un gen BAK o un gen NOXA en la muestra para pruebas; y

c) clasificar al paciente como elegible para recibir tratamiento con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 en base a la presencia o ausencia de al menos una mutación como se determinó en el paso b).

En el método anterior, el agente inductor de poliploidía puede ser un inhibidor de aurora quinasa. El inhibidor de aurora quinasa puede ser un inhibidor de aurora quinasa A, un inhibidor de aurora quinasa B, un inhibidor de aurora quinasa C o combinaciones de los mismos. Más específicamente, el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa B. Por ejemplo, el inhibidor de aurora quinasa B es AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 o Hersperadina.

En el método anterior, el inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 puede ser ABT-263, ABT-737, un inhibidor selectivo de Bcl-X_L o combinaciones de los mismos.

En el método anterior, la muestra para pruebas puede comprender una muestra de tejido. Por ejemplo, la muestra de tejido comprende una muestra de sangre periférica, un tejido tumoral o un tejido tumoral sospechado, una muestra citológica de capa delgada, una muestra de aspirado de aguja delgada, una muestra de médula ósea, una muestra de nódulo linfático, una muestra de orina, una muestra ascítica, una muestra de lavado, una muestra de lavado esofágico, una muestra de lavado vesical o de pulmones, una muestra de fluido espinal, una muestra de fluido cerebral, una muestra de aspirado ductal, una muestra de descarga de pezón, una muestra de efusión pleural, una muestra de tejido congelado fresco, una muestra de

tejido embebido en parafina o un extracto o muestra procesada producida por cualquiera de una muestra de sangre periférica, un tejido tumoral o un tejido tumoral sospechado, una muestra citológica de capa delgada, una muestra de aspirado de aguja delgada, una muestra de médula ósea, una muestra de orina, una muestra ascítica, una muestra de lavado, una muestra de lavado esofágico, una muestra de lavado vesical o de pulmones, una muestra de fluido espinal, una muestra de fluido cerebral, una muestra de aspirado ductal, una muestra de descarga de pezón, una muestra de efusión pleural, una muestra de tejido congelado fresco, una muestra de tejido embebido en parafina.

Adicionalmente, en el método anterior, el paso de determinación (b) puede ser realizado por hibridización *in situ*. Por ejemplo, la hibridización *in situ* puede ser realizada con una sonda de ácido nucleico que está marcada fluorescentemente. Como alternativa, la hibridización *in situ* se realiza con al menos dos sondas de ácido nucleico. En aún otra alternativa, la hibridización *in situ* se realiza con una sonda de ácido nucleico peptídico.

Como alternativa, en el método anterior, el paso de determinación (b) puede ser realizado por reacción en cadena de la polimerasa.

En el método anterior, el paciente también puede, contemporáneamente con, estar recibiendo tratamiento con quimioterapia, radiación o combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, la presente divulgación se relaciona con un método para monitorear un paciente que sufre de cáncer y está siendo tratado con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2. El

método comprende los pasos de:

a) proveer una muestra para pruebas de un paciente que sufre de cáncer y está siendo actualmente tratado con al menos un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2;

b) determinar la presencia o ausencia de al menos una mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: un gen BAX, un gen BAK o un gen NOXA en la muestra para pruebas; y

c) determinar si el paciente debe continuar tratado con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 en base a la presencia o ausencia de al menos una mutación como se determinó en el paso b).

En el método anterior, el agente inductor de poliploidía puede ser un inhibidor de aurora quinasa. El inhibidor de aurora quinasa puede ser un inhibidor de aurora quinasa A, un inhibidor de aurora quinasa B, un inhibidor de aurora quinasa C o combinaciones de los mismos. Más específicamente, el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa B. Por ejemplo, el inhibidor de aurora quinasa B es AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 o Hersperadina.

En el método anterior, el inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 puede ser ABT-263, ABT-737, un inhibidor selectivo de Bcl-X_L o combinaciones de los mismos.

En el método anterior, la muestra para pruebas puede comprender una muestra de tejido. Por ejemplo, la muestra de tejido comprende una muestra de sangre periférica, un tejido tumoral o un tejido tumoral sospechado, una muestra citológica de capa delgada, una muestra de aspirado de aguja delgada, una muestra

de médula ósea, una muestra de nódulo linfático, una muestra de orina, una muestra ascítica, una muestra de lavado, una muestra de lavado esofágico, una muestra de lavado vesical o de pulmones, una muestra de fluido espinal, una muestra de fluido cerebral, una muestra de aspirado ductal, una muestra de descarga de pezón, una muestra de efusión pleural, una muestra de tejido congelado fresco, una muestra de tejido embebido en parafina o un extracto o muestra procesada producida a partir de cualquiera de una muestra de sangre periférica, un tejido tumoral o un tejido tumoral sospechado, una muestra citológica de capa delgada, una muestra de aspirado de aguja delgada, una muestra de médula ósea, una muestra de nódulo linfático, una muestra de orina, una muestra ascítica, una muestra de lavado, una muestra de lavado esofágico, una muestra de lavado vesical o de pulmones, una muestra de fluido espinal, una muestra de fluido cerebral, una muestra de aspirado ductal, una muestra de descarga de pezón, una muestra de efusión pleural, una muestra de tejido congelado fresco, una muestra de tejido embebido en parafina.

Más aún, en el método anterior, el paso de determinación (b) puede ser realizado por hibridización *in situ*. Por ejemplo, la hibridización *in situ* puede ser realizada con una sonda de ácido nucleico que está marcada fluorescentemente. Como alternativa, la hibridización *in situ* se realiza con al menos dos sondas de ácido nucleico. En aún otra alternativa, la hibridización *in situ* se realiza con una sonda de ácido nucleico peptídico.

Como alternativa, en el método anterior, el paso de determinación (b) puede ser realizado por reacción en cadena de la polimerasa.

En el método anterior, el paciente también puede, contemporáneamente con, estar recibiendo tratamiento con quimioterapia, radiación o combinaciones de los

mismos.

En aún otro aspecto, la presente divulgación se relaciona con un método para clasificar un paciente que tiene cáncer que es resistente al tratamiento con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2. El método comprende los pasos de:

a) proveer una muestra para pruebas de un paciente que sufre de cáncer;

b) determinar la presencia o ausencia de al menos una mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: un gen BAX, un gen BAK o un gen NOXA en la muestra para pruebas; y

c) clasificar el paciente como que tiene un cáncer que es resistente al tratamiento con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 en base a la presencia o ausencia de al menos una mutación determinada en el paso b).

En el método anterior, el agente inductor de poliploidía puede ser un inhibidor de aurora quinasa. El inhibidor de aurora quinasa puede ser un inhibidor de aurora quinasa A, un inhibidor de aurora quinasa B, un inhibidor de aurora quinasa C o combinaciones de los mismos. Más específicamente, el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa B. Por ejemplo, el inhibidor de aurora quinasa B es AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 o Hersperadina.

En el método anterior, el inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 puede ser ABT-263, ABT-737, un inhibidor selectivo de Bcl-X_L o combinaciones de los mismos. En el método anterior, la muestra para pruebas puede comprender una muestra de

tejido. Por ejemplo, la muestra de tejido comprende una muestra de sangre periférica, un tejido tumoral o un tejido tumoral sospechado, una muestra citológica de capa delgada, una muestra de aspirado de aguja delgada, una muestra de médula ósea, una muestra de nódulo linfático, una muestra de orina, una muestra ascítica, una muestra de lavado, una muestra de lavado esofágico, una muestra de lavado vesical o de pulmones, una muestra de fluido espinal, una muestra de fluido cerebral, una muestra de aspirado ductal, una muestra de descarga de pezón, una muestra de efusión pleural, una muestra de tejido congelado fresco, una muestra de tejido embebido en parafina o un extracto o muestra procesada producida por cualquiera de una muestra de sangre periférica, un tejido tumoral o un tejido tumoral sospechado, una muestra citológica de capa delgada, una muestra de aspirado de aguja delgada, una muestra de médula ósea, una muestra de orina, una muestra ascítica, una muestra de lavado, una muestra de lavado esofágico, una muestra de lavado vesical o de pulmones, una muestra de fluido espinal, una muestra de fluido cerebral, una muestra de aspirado ductal, una muestra de descarga de pezón, una muestra de efusión pleural, una muestra de tejido congelado fresco o una muestra de tejido embebido en parafina.

Además, en el método anterior, el paso de determinación (b) puede ser realizado por hibridización *in situ*. Por ejemplo, la hibridización *in situ* puede ser realizada con una sonda de ácido nucleico que está marcada fluorescentemente. Como alternativa, la hibridización *in situ* se realiza con al menos dos sondas de ácido nucleico. En aún otra alternativa, la hibridización *in situ* se realiza con una sonda de ácido nucleico peptídico.

Como alternativa, en el método anterior, el paso de determinación (b) puede

ser realizado por reacción en cadena de la polimerasa.

En el método anterior, el paciente también puede, contemporáneamente con, estar recibiendo tratamiento con quimioterapia, radiación o combinaciones de los mismos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En un aspecto, la presente divulgación se relaciona con el descubrimiento de un efecto sinérgico que ocurre en células tumorales y cancerígenas cuando a estas células se les administra una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente inductor de poliploidía y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2. Específicamente, los inventores de la presente divulgación descubrieron que la inducción de poliploidización en ciertas células tumorales y cancerígenas hace o provoca la supervivencia de estas células que resultan en poliplodía dependiente de la actividad antiapoptótica de Bcl-X_L. Más específicamente, la inducción de poliplodía en estas células tumorales y cancerígenas sensibiliza a estas células para la inhibición de Bcl-X_L. Por lo tanto, los inventores han descubierto un método mediado por poliplodía para inducir apoptosis o muerte celular en estas células. Este método involucra administrarle al paciente que sufre de cáncer una combinación de agentes terapéuticos. Específicamente, se administra al paciente al menos un agente inductor de poliploidía. El propósito del agente inductor de poliploidía es inducir poliplodía en una o más células cancerígenas. Como se mencionó anteriormente en la presente, luego de la inducción de poliplodía, la supervivencia de estas células tumorales y cancerígenas poliploides es dependiente de Bcl-X_L. La apoptosis o muerte de estas células tumorales y cancerígenas poliploides puede ser obtenida o alcanzada por administración al paciente de al menos

un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2. El orden en el cual se administra el al menos un agente inductor de poliploidía y el al menos un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 no es crítico. Sin embargo, debido a que las células tumorales y cancerígenas no se sensibilizan a inhibidores de proteínas de la familia Bcl-2 hasta luego de la inducción de poliplodía, se prefiere administrar el al menos un agente inductor de poliploidía al paciente antes o junto con el al menos un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2. En relación al descubrimiento anterior, los inventores de la presente divulgación también descubrieron que las células tumorales y cancerígenas (sin importar si estas células están inducidas o no para ser poliploides o no) que contienen al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana son inmunes o exhiben resistencia a tratamiento con un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 luego de la inducción de poliplodía (tal como con al menos un agente inductor de poliploidía). En otras palabras, las células tumorales y cancerígenas poliploides que contienen al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana no exhiben o experimentan apoptosis o muerte celular cuando se tratan simultáneamente o posteriormente con al menos un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2.

Por lo tanto, en vista de este descubrimiento adicional, en otro aspecto, la

presente divulgación también provee métodos y composiciones para monitorear la resistencia a terapia con agente inductor de poliploidía (tal como un inhibidor de aurora quinasa), terapia con inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una terapia combinada de agente inductor de poliploidía e inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 en células cancerígenas y tumorales. La divulgación provee ensayos diagnósticos para identificar, clasificar y monitorear pacientes con cáncer que comprende evaluar una muestra de ensayo para la presencia o ausencia de al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un gen NOXA humano, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen NOXA humano. Los ensayos de la invención incluyen métodos para identificar pacientes elegibles para recibir un agente inductor de poliploidía, terapia con inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una terapia combinada de agente inductor de poliploidía e inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 (como una terapia combinada o junto con otra terapia (por ejemplo, tal como con quimioterapia, radiación o combinaciones de las mismas) y para monitorear la respuesta del paciente a dicha terapia. La divulgación comprende, por ejemplo, determinar por hibridización fluorescente *in situ* la presencia o ausencia de al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana. Los métodos en la presente pueden ser realizados antes de la inducción de poliplodía o luego de la inducción de poliplodía. Los pacientes clasificados como que tienen una o más mutaciones o un aumento en

una o más mutaciones por encima de un nivel basal (o predeterminado) en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana podrían ser considerados elegibles para recibir al menos un agente inductor de poliploidía, al menos un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o la terapia combinada de un agente inductor de poliploidía y terapia con inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 debido a que dichos pacientes podrían ser considerados como menos probables a que respondan a cada una de esas terapias. Específicamente, los pacientes que son identificados como que tienen una o más mutaciones en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana se creen que son inmunes, resistentes o menos sensibilizados al tratamiento con al menos un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 antes del tratamiento con o luego del tratamiento con al menos un agente inductor de poliploidía (para inducir poliploidización).

En un aspecto, la divulgación comprende un método para identificar o clasificar un paciente como elegible para el tratamiento con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o con un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 (juntos o en combinación con una tercera terapia). El método comprende los pasos de:

(a) proveer una muestra de tejido de un paciente;

(b) determinar la presencia o ausencia de al menos una mutación en (i) un gen

que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana; y

(c) clasificar al paciente como que es elegible para tratamiento con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 en base a la presencia o ausencia de al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana. En el método anterior, un paciente podría ser no elegible para tratamiento con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 en base a la presencia de al menos una mutación o un aumento en el número de una o más mutaciones por encima de un nivel basal (o predeterminado) en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana. Como con los métodos mencionados previamente en la presente, este método puede ser realizado antes o después e la inducción de poliplodía en el paciente.

En este aspecto, el cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer, tal como carcinoma colorrectal o cáncer pancreático. Adicionalmente, en este aspecto, la

amplificación del gen puede ser determinada por un ensayo fluorescente multicolor de hibridización *in situ* (FISH), por ejemplo, realizado en una muestra de biopsia de tumor de cáncer de pulmón. En otros aspectos, se usa el método de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).

En aún otro aspecto, la divulgación comprende un método para identificar o clasificar un paciente que tiene un cáncer que es resistente a terapia con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2, o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2, El método comprende los pasos de:

(a) proveer una muestra para pruebas (por ejemplo, tal como una muestra de tejido) de un paciente;

(b) determinar la presencia o ausencia de al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana; y

(c) clasificar al paciente como que tiene un cáncer que es resistente a un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 en base a la presencia de al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana. Como con los métodos mencionados

previamente en la presente, este método puede ser realizado antes o después de la inducción de poliplodía en el paciente.

En este aspecto, el cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer, tal como carcinoma colorrectal o cáncer pancreático. Adicionalmente, en este aspecto, la amplificación del gen puede ser determinada por un ensayo fluorescente multicolor de hibridización *in situ* (FISH), por ejemplo, realizado en una muestra de biopsia de tumor de cáncer de pulmón. En otros aspectos, se usa la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En aún otro aspecto, la divulgación está dirigida a métodos para monitorear un paciente que está siendo tratado con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2, el método comprende los pasos de:

(a) proveer una muestra para pruebas de un paciente con cáncer que está siendo tratado con al menos un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 (opcionalmente, se pueden identificar o extraer células tumorales o cancerígenas obtenidas de una muestra de tejido);

(b) determinar en la muestra para pruebas (por ejemplo, en las células tumorales o cancerígenas) la presencia o ausencia de al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana; y

(c) comparar el número de mutaciones en (i) un gen que codifica para Bcl-2

proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana de la muestra para pruebas (tal como en las células tumorales o cancerígenas) contra un nivel basal o un nivel predeterminado; y

(d) determinar si el paciente debe continuar siendo tratado con el agente inductor de poliploidía, inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía e inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 en base a la comparación en el paso (c). Como con los métodos mencionados previamente en la presente, este método puede ser realizado antes o después de la inducción de poliplodía en el paciente.

La comparación (o análisis informacional) del número de una o más mutaciones determinadas a partir de la muestra para pruebas con el nivel basal o predeterminado puede ser hecho por un sistema automatizado, tal como un programa de computación o sistema inteligente que es parte, o compatible con, del equipamiento (por ejemplo, plataforma de computadora) en el cual se realiza el ensayo. Como alternativa, esta comparación o análisis informacional puede ser hecho por un médico.

Específicamente, si la muestra para pruebas (por ejemplo, las células tumorales o cancerígenas) que tiene al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana es la misma o mayor que el nivel basal o nivel

predeterminado, entonces el tratamiento con el agente inductor de poliploidía, inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 puede ser discontinuado, detenido o terminado. Como alternativa, el médico tratante puede decidir combinar el agente inductor de poliploidía con al menos una segunda terapia (por ejemplo, tratamiento con una segunda molécula pequeña) como una terapia combinada. Aún como otra alternativa, el médico tratante puede decidir combinar el inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 con al menos una segunda terapia (por ejemplo, tratamiento con una segunda molécula pequeña) como una terapia combinada. Sin embargo, si al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana es menos que el nivel basal o el nivel predeterminado o si no se detectan mutaciones en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana entonces el tratamiento con el agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 puede ser continuado. Nuevamente, dependiendo de los resultados obtenidos con dicho tratamiento, el médico tratante puede decidir combinar el agente inductor de poliploidía con al menos una segunda terapia (por ejemplo, tratamiento con una segunda molécula pequeña) como una terapia combinada. Como

alternativa, dependiendo de los resultados obtenidos con dicho tratamiento, el médico tratante puede decidir combinar el inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 terapia con al menos una segunda terapia (por ejemplo, tratamiento con una segunda molécula pequeña).

Nuevamente, se pueden usar los métodos FISH y PCR para detectar la presencia o ausencia de al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen de BAX humana y un gen de BAK humana), (ii) un gen de NOXA humana, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen para BAX humana y un gen para BAK humana) y un gen de NOXA humana en una muestra para pruebas obtenida de un paciente.

La divulgación también está dirigida a conjuntos de componentes que empacan, por ejemplo, oligo o polinucleótidos diseñados para ser usados como cebadores de PCR, sondas de FISH, etc.

La divulgación tiene capacidad significativa para proveer estratificación de pacientes para terapia para el cáncer, y en particular para la terapia con agente inductor de poliploidía, terapia con inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2 o una terapia combinada de agente inductor de poliploidía terapia e inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2. La evaluación de estos biomarcadores de acuerdo a la presente divulgación también permite el seguimiento de la respuesta del individuo a la terapia.

A. Definiciones

Los títulos de las secciones como se usan en esta sección y la divulgación completa en la presente no tienen como intención ser limitantes.

Como se las usa en la presente documentación, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen las referencias plurales, a menos que en el contexto se indique

claramente lo contrario. En las citas de los rangos numéricos en la presente documentación se contempla explícitamente cada número incluido de dicho rango con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el rango 6-9 se contemplan los números 7 y 8, además de 6 y 9, y para el rango 6,0-7,0 se contemplan explícitamente los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0.

a) Antitumorigénesis

Como se usa en la presente, el término "antitumorigénesis", hace referencia a una reducción del crecimiento del tumor.

b) inhibidor de aurora quinasa

Un "inhibidor de aurora quinasa" hace referencia a un compuesto terapéutico de cualquier tipo (por ejemplo, no selectivo o selectivo), que incluye una molécula pequeña, anticuerpo, antisentido, ARN de interferencia pequeño, o compuestos basados en microARN, que se une a al menos uno de aurora quinasa A, aurora A, aurora quinasa B, aurora B, aurora quinasa C o aurora C, y antagoniza la actividad de al menos un ácido nucleico relacionado o proteína aurora quinasa A, aurora A, aurora quinasa B, aurora B, aurora quinasa C o aurora C.

c) Inhibidor de aurora quinasa A

Un "inhibidor de aurora quinasa A" hace referencia a un compuesto terapéutico de cualquier tipo (por ejemplo, no selectivo o selectivo), que incluye una molécula pequeña, anticuerpo, antisentido, ARN de interferencia pequeño, o compuestos basados en microARN, que se une a al menos uno de aurora quinasa A o aurora A, y antagoniza la actividad de la aurora quinasa A o ácido nucleico relacionado o proteína aurora A. Los métodos de la presente divulgación son útiles con cualquier inhibidor de aurora quinasa A conocido o a partir de aquí desarrollado. Los ejemplos de un

inhibidor de aurora quinasa A son PHA-739358, MLN-8054, R-763, JNJ-7706621, MP-529 y MP-235.

d) Inhibidor de aurora quinasa B

Un "inhibidor de aurora quinasa B" hace referencia a un compuesto terapéutico de cualquier tipo (por ejemplo, no selectivo o selectivo), que incluye una molécula pequeña, anticuerpo, antisentido, ARN de interferencia pequeño, o compuestos basados en microARN, que se une a al menos uno de aurora quinasa B o aurora B, y antagoniza la actividad de la aurora quinasa B o ácido nucleico relacionado o proteína aurora B. Por ejemplo, se conoce que un número de inhibidores de aurora quinasa B inhiben al menos uno de la fosforilación de histona H3 o división celular. Adicionalmente, se conoce que un número de inhibidores de aurora quinasa B inducen apoptosis en al menos un sistema celular (tal como una línea celular de leucemia mieloide aguda, un cultivo de leucemia mieloide aguda primaria, etc.). Los métodos de la presente divulgación son útiles con cualquier inhibidor de aurora quinasa B conocido o a partir de aquí desarrollado. Los ejemplos de un inhibidor de aurora quinasa B son AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 y Hesperadina.

AZD1152, también conocido como, fosfato diácido de 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-Fluorofenil)amino]-2-oxoetil}-1*H*-pirazol-3-il)amino]-quinazolin-7-il}oxi)propil](etil)amino]etilo, es una prodroga de un inhibidor pirazoloquinazolina de aurora quinasa (AZD1152-hidroxiquinazolina pirazol anilida (HQPA)) y se convierte rápidamente al AZD1152-HQPA activo en plasma (véase, Mortlock, AA, et al., *J. Med. Chem.,* 50:2213-24 (2007)). AZD1152-HQPA es un inhibidor altamente potente y selectivo de aurora B.

ZM447439, también conocido como 4-(4-(*N*-benzoilamino)anilino)-6-metoxi-7-

(3-(1-morfolino)propoxi)quinazolina, es un derivado quinazolina, inhibe aurora A y aurora B. La estructura química de ZM447439 se provee en Ditchfield, C., et al., *J. Cell Bio.,* 161(2):267-280 (2003) y Montembault, E., et al., *Drugs of the Future*, 30(1):1-9 (2005).

VX-680/MK0457 es un ácido ciclopropano carboxílico de {4-[4-(4-metil-piperazin-1-il)-6-(5-metil-2H-pirazol-3-ilamino)-pirimidin-2-ilsulfanil]-fenil}-amida e inhibe aurora A, aurora B y aurora C. La estructura química de VX-680/MK0457 se provee en Montembault, E., et al., *Drugs of the Future*, 30(1):1-9 (2005).

Hesperadina, una indolinona, inhibe aurora B. La estructura química de Hesperadina se provee en Hauf, S., et al., *J. Cell Bio.,* 161(2):281-294 (2003) y Montembault, E., et al., *Drugs of the Future*, 30(1):1-9 (2005).

e) Inhibidor de aurora quinasa C

Un "inhibidor de aurora quinasa C" hace referencia a un compuesto terapéutico de cualquier tipo (por ejemplo, no selectivo o selectivo), que incluye una molécula pequeña, anticuerpo, antisentido, ARN de interferencia pequeño, o compuestos basados en microARN, que se une a al menos uno de aurora quinasa C o aurora C, y antagoniza la actividad de la aurora quinasa C o ácido nucleico relacionado o proteína aurora C. Los métodos de la presente divulgación son útiles con cualquier inhibidor de aurora quinasa C conocido o a partir de aquí desarrollado. Los ejemplos de un inhibidor de aurora quinasa C son AZD1152 y VX-680/MK-0457.

f) Que consiste esencialmente de un polinucleótido que tiene un % de identidad de secuencia

"Que consiste esencialmente de un polinucleótido que tiene un % de identidad de secuencia" significa que el polinucleótido no difiere sustancialmente en longitud,

pero puede diferir sustancialmente en la secuencia. Por lo tanto, un polinucleótido "A" que consiste esencialmente de un polinucleótido que tiene un 80% de identidad de secuencia con una secuencia conocida "B" de 100 nucleótidos significa que el polinucleótido "A" tiene aproximadamente 100 nucleótidos (nts) de largo, pero hasta 20 nts pueden cariar respecto a la secuencia "B". La secuencia del polinucleótido en cuestión puede ser más larga o más corta debido a modificación del extremo terminal, tal como, por ejemplo, la adición de entre 1 y 15 nucleótidos para producir tipos específicos de sondas, cebadores y otras herramientas moleculares, etc., tal como el caso de cuando se agregan secuencias sustancialmente no idénticas para crear estructuras secundarias intencionales. Dichos nucleótidos no idénticos no son considerados en el cálculo de la identidad de secuencia cuando la secuencia es modificada por "que consiste esencialmente de".

g) Bcl-2

Como se usa en la presente, el término "Bcl-2" hace referencia a una familia de proteínas pro y antiapoptóticas que constituyen un punto crítico de control para la apoptosis. Los miembros de esta familia incluyen proteínas pro y antiapoptóticas y comparten homología en hasta cuatro regiones conservadas llamadas dominios de homología (BH) 1-4 de Bcl-2. La familia puede ser dividida en tres subclases principales: proteínas antiapoptóticas, proteínas proapoptóticas, proteínas "sólo BH3".

Las proteínas antiapoptóticas, las cuales incluyen Bcl-2 y Bcl-X_L, son todas "multidominio", que comparten homología a lo largo de los cuatro dominios BH. Sin embargo, las proteínas proapoptóticas pueden ser subdivididas adicionalmente e incluyen proteínas de multidominio, tal como BAX y BAK, las cuales poseen homología de secuencia en los dominios BH1-3. Las proteínas "sólo BH3" más distantemente

relacionadas son hasta la actualidad todas proapoptóticas y comparten homología de secuencia en la región BH3 anfipática de α-hélice, la cual es requerida para su función apoptótica.

El gen BAK humano que codifica para BAK humana tiene el No. de acceso U23765, y se describe en Chittenden et al. *Nature* 374:733-736 (1995). El gen BAK-2 humano tiene el No. de acceso U16812, y se describe en Kiefer et al., *Nature* 374:736-739 (1995). Los genes BAX humanos que codifican para BAX humana tienen los Nos. de acceso L22475, L22474 y L22473, y se describen en Oltvai et al., *Cell* 74:609-619 (1993).

Como se usa en la presente, la frase "gen que codifica para Bcl-2 proproapoptótica humana" hace referencia a un gen que codifica para al menos una proteína Bcl-2 humana proapoptótica o fragmento de la misma tal como, por ejemplo, BAK humana o BAX humana.

Las "proteínas sólo BH3" constituyen el tercer subconjunto de la familia Bcl-2 e incluye, por ejemplo, BID, NOXA, PUMA, BIK, BIM y BAD. Estas proteínas comparten homología de secuencia sólo en la región BH3 anfipática hélice cuyo análisis de mutación indicó que es requerida en los miembros proapoptóticos para su actividad de muerte.

El gen BID humano que codifica para BID humana tiene No. de acceso NM_197966, NM_197967, NM_001196 y está descripto en el Genbank. El gen NOXA humano que codifica para NOXA humana tiene No. de acceso NM_021127 y está descripto en el Genbank. El gen PUMA humano que codifica para PUMA humana tiene No. de acceso NM_001127242, NM_001127241, NM_001127240, NM_014417 y está descripto en el Genbank. El gen BIK human que codifica para BIK humana tiene

el No. de acceso NM_001197 y está descripto en el Genbank. El gen BIM humano que codifica para BIM humana tiene el No. de acceso NM_138621, NM_207002, NM_006538, BC033694, AY305714, AY305716, AY423443, AY423442, AY423441 y está descripto en el Genbank. El gen BAD humano que codifica para BAD humana tiene el No. de acceso NM_032989, NM_004322, BC095431 y está descripto en el Genbank.

Como se usa en la presente, la frase, "gen que codifica para BH3 humana" hace referencia a un gen que codifica para al menos una proteína Bcl-2 human sólo BH3 o fragmento de la misma, tal como, por ejemplo, BID humana, NOXA humana, PUMA humana, BIK humana, BIM humana y BAD humana.

h) inhibidor de proteínas de la familia Bcl-2, inhibidor de la familia Bcl-2 o inhibidor de una proteína de la familia Bcl-2

Como se usa en la presente, las frases "inhibidor de proteína de la familia Bcl-2", "inhibidor de la familia Bcl-2" o "inhibidor de una proteína de la familia Bcl-2" como se usa indistintamente en la presente, hace referencia a un compuesto terapéutico de cualquier tipo (por ejemplo, no selectivo o selectivo), que incluye una molécula pequeña, anticuerpo, antisentido, ARN de interferencia pequeño, o compuestos basados en microARN, que se une y antagoniza o inhibe la actividad de al menos un gen o proteína de la familia Bcl-2 que gobierna la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) y es antiproapoptótica (tal como Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Bcl-B, BFL-1 y MCl-1). Los ejemplos de inhibidores de proteínas de la familia Bcl-2 incluyen los compuestos descriptos en la Sección B en la presente (a saber, ABT-263 (que es N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-5,5-dimetil-1-ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(morfolin-4-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-

((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida)), ABT-737 (N-(4-(4-((4'-cloro(1,1'-bifenil)-2-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(dimetilamino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-nitrobencensulfonamida, descripto en las Solicitudes de Patente de los EE.UU. publicadas Nos. 20050159427 y 20060128706, inhibidores de Bcl-X_L \ y combinaciones de los mismos.

i) Inhibidor(es) selectivo(s) de Bcl-X_L

Como se usa en la presente, la frase "inhibidor(es) selectivo(s) de Bcl-X_L", hace referencia a un inhibidor de Bcl-X_L que exhibe una selectividad por Bcl-X_L sobre Bcl-2. Los métodos para determinar si un inhibidor de Bcl-X_L es un inhibidor selectivo de Bcl-X_L son bien conocidos en el arte. Específicamente, dichos métodos involucran determinar las constantes de inhibición (Ki) para los compuestos inhibidores de Bcl-X_L y las relaciones de selectividad de unión (por ejemplo, Bcl-X_L K_i:Bcl-2 K_i). La constante de inhibición (Ki) es la constante de disociación de un complejo enzima-inhibidor o un complejo de proteína/molécula pequeña, en donde la pequeña molécula está inhibiendo la unión de una proteína a otra proteína o péptido. Las constantes de inhibición pueden ser determinadas usando el ensayo de Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia con resolución temporal (TR-FRET). Cuando la K_i para un compuesto se representa como ">" (mayor que) un cierto valor numérico, tiene como intención significar que el valor de afinidad de unión (por ejemplo, para Bcl-X_L) es mayor que el determinado en el ensayo. Cuando la relación de selectividad de unión para un compuesto está representada como ">" (mayor que) un cierto valor numérico, tiene como intención significar que la selectividad de un compuesto particular por Bcl-XL sobre Bcl-2 es al menos tan grande como el número indicado. Cuando la K_i para un compuesto está representada como "<" (menor que) un cierto

valor numérico, tiene como intención significar que el valor de afinidad de unión (por ejemplo, para Bcl-2) es menor que el límite de detección del ensayo usado. Las constantes de inhibición se determinaron usando la ecuación de Wang (Wang Zx,. An Exact Mathematical Expression For Describing Competitive Binding Of Two Different Ligands To A Protein Molecule. *FEBS Lett.* 1995, 360:111-4).

j) Expresión, inhibición antisentido y cosupresión

"Expresión" hace referencia a la producción de un producto final funcional. La expresión de un gen comprende la transcripción del gen y la traducción del ARNm en una proteína precursora o madura. La expresión "inhibición antisentido" hace referencia a la producción de transcriptos de ARN antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína que constituye el blanco. El término "co-supresión" hace referencia a la producción de transcriptos de ARN en el sentido del marco de lectura capaces de suprimir la expresión de genes extraños o endógenos idénticos o sustancialmente similares (véase la Patente de los EEUU Nº 5231020).

k) Aislado

Como se usa en la presente, el término "aislado" en el contexto de moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos hace referencia a una molécula de ácido nucleico o polinucleótido que es separado de otras moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico o polinucleótido. Adicionalmente, una molécula de ácido nucleico "aislada" o polinucleótido, tal como una molécula de ADNc, puede ser sustancialmente libre de otros materiales celulares, o medio de cultivo cuando es producida por técnicas recombinantes, sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando es sintetizada químicamente. En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico

o polinucleótidos son aisladas.

l) Gen

El término "gen" hace referencia a un fragmento de ácido nucleico a partir del cual se expresa una proteína específica, incluyendo las secuencias reguladoras que preceden a la secuencia codificante (secuencias no codificantes 5') y aquellas que la siguen (secuencias no codificantes 3').

m) Constante de inhibición o Ki

Como se usa en la presente, "constante de inhibición" o "Ki" hace referencia a la constante de disociación de un complejo enzima-inhibidor o un complejo de proteína/molécula pequeña, en donde la molécula pequeña está inhibiendo la unión de una proteína a otra proteína. Un valor grande de Ki indica una afinidad de unión baja, y un valor de Ki pequeño indica una afinidad de unión alta. Ki puede ser determinada usando cualquier método conocido en el arte, tal como usando la ecuación de Wang (Wang Z X,. An Exact Mathematical Expression For Describing Competitive Binding Of Two Different Ligands To A Protein Molecule. *FEBS Lett.* 1995; 360:111-4). Una medida típica de afinidad de unión de un inhibidor de proteína antiproapoptótica es el balance entre los procesos de unión y disociación entre la proteína y el inhibidor (Ki).

n) Gen nativo y construcción quimérica

"Gen nativo" hace referencia a un gen como se lo encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias regulatorias. Por contraste, la expresión "construcción quimérica" hace referencia a una combinación de fragmentos de ácidos nucleicos que normalmente no se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, una construcción quimérica puede comprender secuencias reguladoras y secuencias

codificantes derivadas de distintas fuentes o secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero en una disposición diferente de la hallada normalmente en la naturaleza.

o) Por ciento (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico

"Por ciento (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" respecto a secuencias de ácido nucleico está definido como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia de interés, luego de alinear las secuencias e introducir regiones de no apareamiento, si es necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de identidad de secuencia. El alineamiento con el propósito de determinar el % de identidad de secuencia del ácido nucleico se puede lograr de diferentes maneras que se están dentro de la experiencia en el arte, por ejemplo, usando programas de computación disponibles públicamente tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN o el programa de computación Megalign (DNASTAR). Aquellos con experiencia en el arte pueden determinar parámetros adecuados para medir alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesitado para lograr el máximo alineamiento a lo largo de toda la longitud de las secuencias que están siendo comparadas.

Cuando las secuencias de nucleótidos se alinean, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia dada de ácido nucleico C a, con, o contra una dada secuencia de ácido nucleico D (que puede como alternativamente ser enunciado como una dada secuencia de ácido nucleico C que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de ácido nucleico a, con, o contra una dada secuencia de ácido nucleico D) puede ser calculado como sigue:

% de identidad de secuencia de ácido nucleico = W/Z*100

donde

W es el número de nucleótidos clasificados como coincidencias idénticas por el alineamiento de programas o algoritmos de alineamiento de secuencias C y D

y

Z es el número total de nucleótidos en D.

Cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C a D no igualará el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D a C.

p) Reacción en cadena de la polimerasa o PCR

Las frases "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" hacen referencia a una técnica para la síntesis de grandes cantidades de segmentos de ADN específicos que consiste en una serie de ciclos repetitivos (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Típicamente se desnaturaliza ADN de cadena doble con calor, se alinean dos cebadores complementarios con los extremos 3' del segmento blanco a una temperatura baja y luego se realiza una extensión a una temperatura intermedia. Un conjunto de estos tres pasos consecutivos se conoce como un ciclo.

PCR es una técnica poderosa usada para amplificar ADN millones de veces, por replicación repetida de un molde, en un período de tiempo corto. (Mullis, K., et al., *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-73 (1986)); Solicitud de Patente Europea No. 50.424; Solicitud de Patente Europea No. 84.796; Solicitud de Patente Europea No. 258.017, Solicitud de Patente Europea No. 237.362; Solicitud de Patente Europea No. 201.184, Patente de los EE.UU. No. 4.683.202; Patente de los EE.UU.

No. 4.582.788; y Patente de los EE.UU. No. 4.683.194). En el proceso se usa un conjunto de oligonucleótidos específicos sintetizados *in vitro* para cebar la síntesis de ADN. El diseño de los cebadores depende de las secuencias de ADN que se desea analizar. Esta técnica se lleva a cabo durante muchos ciclos (usualmente 20-50) de fusión del molde a una temperatura elevada, con lo que se permite que los cebadores se alineen con las secuencias complementarias en el molde y que luego se replique el molde con la ADN polimerasa.

La separación de los productos de las reacciones de PCR se pueden analizar en geles de agarosa, a lo que sigue una coloración con bromuro de etidio y una visualización con transiluminación UV. Como alternativa, pueden agregarse dNTP radiactivos a la PCR para incorporar una marca en los productos. En este caso los productos de PCR se visualizan por exposición del gel a una película para rayos X. La ventaja agregada de radiomarcar productos de PCR es que los niveles de productos de amplificación individuales pueden ser cuantificados.

q) Polinucleótido

Un "polinucleótido" es un polímero de ácido nucleico de ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN), ARN o ADN modificado, o miméticos de ARN o ADN (tal como PNA), y derivados de los mismos, y homólogos de los mismos. Por lo tanto, los polinucleótidos incluyen compuestos de bases nucleicas de origen natural, azúcares e uniones internucleósido covalentes (esqueleto) así como polímeros que tienen porciones que no son de origen natural que funcionan similarmente. Dichos polímeros de ácido nucleico modificados o sustituidos son bien conocidos en el arte y están referidos como "análogos". Los oligonucleótidos son generalmente polinucleótidos cortos de entre aproximadamente 10 hasta aproximadamente entre

160 y 200 nucleótidos.

Los polinucleótidos también comprenden cebadores que hibridizan específicamente con secuencias blanco, que incluyen análogos y/o derivados de las secuencias de ácido nucleico, y homólogos de los mismos.

Los polinucleótidos se pueden preparar por técnicas convencionales, tales como síntesis en fase sólida usando equipamiento disponible comercialmente, tal como el disponible de Applied Biosystems USA Inc. (Foster City, CA; EE.UU.), DuPont, (Wilmington, DE; EE.UU.), o Milligen (Bedford, MA; EE.UU.). Los polinucleótidos modificados, tal como derivados fosforotioatos y alquilados, también se pueden preparar fácilmente por métodos similares conocidos en el arte (véase, Patentes de los EE.UU. Nos. 4.948.882, 5.464.746, y 5.424.414).

r) Análogos de polinucleótidos

Como se usa en la presente, el término "análogos de polinucleótidos" hace referencia a polímeros que tienen esqueletos modificados o uniones internucleósido no naturales. Los esqueletos modificados incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en el esqueleto, tal como fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos, así como aquellos que ya no tienen un átomo de fósforo, tal como esqueletos formados por uniones internucleósido de alquilo de cadena corta o cicloalquilos, heteroátomo mezclado y uniones internucleósido alquilo o cicloalquilo, o una o más uniones internucleósido heteroatómica de cadena corta o heterocíclica. Los polímeros de ácido nucleico modificados (análogos) pueden contener uno o más grupos de azúcar modificados.

Los análogos que son miméticos de ARN o ADN, en los cuales el azúcar y la

000251

unión internucleósido de las unidades de nucleótido están reemplazados por grupos novedosos, también son útiles. En estos miméticos, las unidades base se mantienen por hibridización con la secuencia blanco. Un ejemplo de dicho mimético, que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridización, es un ácido nucleico peptídico (PNA) (véase, Buchardt, O., P. Nielsen, and R. Berg. 1992. *Peptide Nucleic Acids*).

s) Agente inductor de poliploidía

Como se usa en la presente, la frase "agente inductor de poliploidía" hace referencia a un compuesto terapéutico de cualquier tipo (por ejemplo, no selectivo o selectivo), que incluye una molécula pequeña, anticuerpo, antisentido, ARN de interferencia pequeño, o compuestos basados en microARN, que inducen poliplodía en una o más células. Los métodos para determinar la inducción o evidencia de poliplodía en una o más células se pueden obtener usando técnicas de rutina conocidas en el arte. Por ejemplo, la evidencia de poliplodía se puede determinar por detección de expresión elevada de p53. p53 es un sustituto para la poliploidización en células que portan p53 de tipo salvaje (véase, Gizatullin, F. et al., "The aurora kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function", *Cancer Res.* 66, 7668-77. (2006)). Adicionalmente, las células en las cuales se ha inducido la poliplodía exhiben un aumento morfológico importante en tamaño celular y multinucleación, de los cuales ambos se pueden detectar usando técnicas de rutina conocidas en el arte.

Los ejemplos de agentes inductores de poliploidía, incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, inhibidores de aurora quinasa, inhibidores de microtúbulos (tal como, por ejemplo, taxotere, vincristina, nocodazol, paclitaxel o colcemid), inhibidores

pan-quinasa (tal como, por ejemplo, estaurosporina), virus oncolíticos (tal como, por ejemplo, ONYX-015), naranja de acridina, Dolastain-10, Noscapina, inhibidores de topoisomerasa II (tal como, por ejemplo, ICRF-187 o ICRF-193), ácido 2-{4-[(7-cloro-2-quinoxalinil)oxi]fenoxi}propiónico, ácido 2-{4-[(7-bromo-2-quinolinil)oxi]fenoxi}propiónico, Platicodin D, venenos de microtúbulos (tal como, por ejemplo, JG-03-14), inhibidores de polimerización de actina (tal como, por ejemplo, Citocalasina B), Bistramida A o antibióticos antitumorales (tal como, por ejemplo, Mitramicina SKI).

t) Nivel predeterminado

Como se usa en la presente, el término "nivel predeterminado" hace referencia generalmente a un valor de corte de ensayo que se usa para evaluar los resultados diagnósticos por comparación de los resultados del ensayo contra el nivel predeterminado, y cuando el nivel predeterminado ya ha sido unido o asociado con diferentes parámetros clínicos (por ejemplo, riesgo de evaluación, severidad de la enfermedad, progresión/no progresión/mejoría, determinación de la edad de una muestra para pruebas, determinar si una muestra para pruebas (por ejemplo, suero o plasma) se ha hemolizado, etc.). Un ejemplo de un nivel predeterminado que se puede usar es un nivel basal obtenido de uno o más sujetos que pueden ocasionalmente estar sufriendo de una o más enfermedades o condiciones. Es bien conocido que los valores de corte pueden variar dependientes de la naturaleza del ensayo. Se encuentra más bien dentro de la experiencia ordinaria en el arte el adaptar la divulgación en la presente para otros ensayos para obtener valores de corte específicos de ensayo para aquellos otros ensayos basados en esta descripción.

u) Cebador o sonda

Un "cebador" o "sonda" como se usa en la presente es un polinucleótido que tiene al menos 8 nucleótidos de longitud y forma una estructura híbrida con una secuencia blanco, debido a la complementariedad de al menos una secuencia en la sonda o cebador con una secuencia en la región blanco. Las regiones de polinucleótidos de la sonda que pueden estar compuestas de ADN y/o ARN y/o análogos de nucleótidos sintéticos. Preferentemente, la sonda no contiene una secuencia que es complementaria con la secuencia o secuencias usadas para sensibilizar para una secuencia blanco durante la reacción en cadena de la polimerasa.

v) Recombinante

El término "recombinante" hace referencia a una combinación artificial de dos segmentos de secuencia que de otro modo se encontrarían separados, por ejemplo, por síntesis mecánica o mediante la manipulación de segmentos de ácidos nucleicos aislados merced a técnicas de ingeniería genética.

w) Hibridiza específicamente

"Hibridiza específicamente" hace referencia a la capacidad de un ácido nucleico para unirse detectable y específicamente a un segundo ácido nucleico. Los polinucleótidos hibridizan específicamente con hebras blanco de ácido nucleico bajo condiciones de hibridización y lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable por ácidos nucleicos no específicos.

x) Rigor o condiciones rigurosas

La especificidad de ADN de hebra simple para hibridizar ADN de hebra simple para hibridizar fragmentos complementarios está determinada por el rigor de las condiciones de la reacción. El rigor de la hibridización aumenta a medida que

disminuye la propensión a formar dúplex de ADN. En reacciones de hibridización de ácido nucleico, el rigor puede ser elegido para favorecer hibridizaciones específicas (rigor alto). Se pueden usar hibridizaciones menos específicas (rigor bajo) para identificar moléculas de ADN relacionadas, pero no exactas, (homólogas, pero no idénticas) o segmentos.

Los dúplex de ADN se estabilizan por: (1) el número de pares de bases complementarias, (2) el tipo de pares de bases, (3) concentración de sal (fuerza iónica) de la mezcla de reacción, (4) la temperatura de la reacción, y (5) la presencia de ciertos solventes orgánicos, tal como formamida, que disminuye la estabilidad del dúplex de ADN. Una estrategia común es variar la temperatura: temperaturas relativamente mayores dan como resultado condiciones más rigurosas. (Véase, Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, et al. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, New York) provee una excelente explicación del rigor en las condiciones de hibridización.

La hibridización bajo "condiciones rigurosas" hace referencia a protocolos de hibridización en los cuales las secuencias de nucleótidos al menos 60% homólogas una con la otra permanecen hibridizadas.

Los polinucleótidos pueden incluir otros grupos anexos tales como péptidos (por ejemplo, para direccionar a receptores de células huésped *in vivo*), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular. Adicionalmente, los oligonucleótidos se pueden modificar con agentes de clivado iniciados por hibridización (véase, van der Krol et al., *Biotechniques*. 6:958-76 (1988) o agentes intercalantes (Zon, G., *Pharm Res*. 5:539-49 (1988)). El oligonucleótido se puede conjugar con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de entrecruzamiento

iniciado por hibridización, un agente transportador, un agente de clivado iniciado por hibridización, y similares.

y) Sujeto(s) o paciente(s)

Como se usan en la presente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente independientemente de si el sujeto tiene o está actualmente bajo cualquier forma de tratamiento. Como se usan en la presente, los términos "sujeto" y "sujetos" hacen referencia a cualquier vertebrado, que incluye, a modo de ejemplo ilustrativo a, un mamífero (por ejemplo, vaca, cerdo, camello, llama, caballo, cabra, conejo, oveja, hámsters, cobayo, gato, perro, rata, y ratón, un primate no humano (por ejemplo, un mono, tal como un mono cinomólogo, chimpancé, etc.) y un humano). Preferentemente, el sujeto es un humano. Los sujetos o pacientes pueden estar vivos o muertos.

z) Secuencia blanco o secuencia de ácido nucleico blanco

"Secuencia blanco" o "secuencia de ácido nucleico blanco" hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que abarca, por ejemplo, un gen, o complementos o fragmentos del mismo, que es amplificado, detectado, o ambos usando un cebador o sonda de polinucleótido. Adicionalmente, si bien el término secuencia blanco a veces hace referencia a una secuencia de ácido nucleico de hebra doble; una secuencia blanco también puede ser de hebra simple. En casos en donde el blanco es de hebra doble, las secuencias de cebadores de polinucleótido preferentemente amplifican ambas hebras de la secuencia blanco. Una secuencia blanco se puede seleccionar que sea más p menos específica para un organismo particular. Por ejemplo, la secuencia blanco puede ser específica par aun género completo, para más de un género, para una especie o subespecie, serogrupo, auxotipo, serotipo, cepa, aislado u

otro subconjunto de organismos.

aa) Muestra para prueba

"Muestra para pruebas" hace referencia a una muestra tomada de un sujeto, o un fluido biológico, en donde la muestra puede contener una secuencia blanco. Una muestra para pruebas puede ser tomada de cualquier fuente, por ejemplo, tejido, sangre, saliva, esputo, moco, sudor, orina, hisopados uretrales, hisopados cervicales, hisopados urogenitales o anales, hisopados conjuntivales, fluido de lentes ocular, líquido cefalorraquídeo, etc. Una muestra para prueba puede ser usada (i) directamente como se obtuvo de la fuente; o (ii) luego de un pretratamiento para modificar el carácter de la muestra. Por lo tanto, una muestra para pruebas puede ser pretratada antes del uso por, por ejemplo, preparación del plasma o suero a partir de sangre, ruptura de células o partículas virales, preparación de líquidos a partir de materiales sólidos, dilución de fluidos viscosos, filtrado de líquidos, agregado de reactivos, purificación de ácidos nucleicos, etc.

bb) Cantidad terapéuticamente eficaz

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a una cantidad de droga, que es eficaz para producir un efecto terapéutico deseado con la administración de un paciente, por ejemplo, para detener el crecimiento, o provocar el encogimiento, de un tumor canceroso o para producir la muerte de una célula cancerosa o tumor.

cc) "Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia con resolución temporal"

Como se usa en la presente, la frase "Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia con resolución temporal" o "TR-FRET" hace referencia a un ensayo

que une los principios de TRF (Fluorescencia con resolución temporal) y FRET (Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia). Un número de ensayos de TR-FRET son conocidos y están disponibles comercialmente en el arte. Un ejemplo de una TR-FRET que se puede usar en la presente invención se describe más abajo.

Síntesis de sonda

Todos los reactivos descriptos más abajo para usar se pueden obtener del proveedor a menos que se especifique de otro modo. Los reactivos para la síntesis peptídica que incluyen diisopropiletilamina (DIEA), diclorometano (DCM), N-metilpirrolidona (NMP), 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU), N-hidroxibenzotriazol (HOBt) y piperidina se pueden obtener de Applied Biosystems, Inc. (ABI), Foster City, CA o American Bioanalytical, Natick, MA. Los cartuchos precargados con aminoácido 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) (Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmor-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH) se pueden obtener de ABI o Anaspec, San Jose, CA. La resina para síntesis de péptidos (resina Fmoc-Rink amida MBHA) y Fmoc-Lys(Mtt)-OH se pueden obtener de Novabiochem, San Diego, CA. El isómero simple de 6-carboxifluoresceína succinimidil éster (6-FAM-NHS) se puede obtener de Anaspec. El ácido trifluoroacético (TFA) se puede obtener de Oakwood Products, West Columbia, SC. Tioanisol, fenol, triisopropilsilano (TIS), 3,6-dioxa-1,8-octaneditiol (DODT) e isopropanol se pueden obtener de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI. Los espectros de masa por desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS) se pueden

registrar en Applied Biosystems Voyager DE-PRO MS). Los espectros de masas por electroaspersión (ESI-MS) se pueden registrar en un Finnigan SSQ7000 (Finnigan Corp., San Jose, CA) en ambos modos iónicos positivo y negativo.

Procedimiento general para la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)

Los péptidos se pueden sintetizar con, como mucho, 250 µmol de resina Wang precargada/recipiente en un sintetizador de péptidos ABI 433A usando ciclos de acoplamiento Fastmoc™ a escala 250 µmol. Los cartuchos precargados conteniendo 1 mmol de Fmoc-aminoácidos estándares, excepto por la posición de unión del fluoróforo, en donde se puede colocar 1 mmol de Fmoc-Lys(Mtt)-OH en el cartucho, y usados con monitoreo por retroalimentación de conductividad. L acetilación N-terminal se puede lograr con el uso de 1 mmol de ácido acético en un cartucho bajo condiciones de acoplamiento estándares.

Eliminación de 4-Metiltritil (Mtt) de Lisina

La resina del sintetizador se puede lavar tres veces con DCM y mantenerla húmeda. Se pueden hacer pasar 150 mL de 95:4:1 de diclorometano:triisopropilsilano:ácido trifluoroacético a través del lecho de resina durante 30 minutos. La mezcla se debe volver amarillo oscuro y luego virar a amarillo pálido. Se pueden hacer pasar 100 mL de DMF a través del lecho durante 15 minutos. La resina luego se puede lavar tres veces con DMF y filtrarla. Las pruebas de ninhidrina deben mostrar una señal fuerte para amina primaria.

Marcaje de resina con 6-Carboxifluoresceína-NHS (6-FAM-NHS)

La resina se puede tratar con 2 equivalentes de 6-FAM-NHS en 1% DIEA/DMF y agitar o sacudir a temperatura ambiente durante la noche. Cuando se completa, la resina puede ser escurrida, lavada tres veces con DMF, tres veces con (DCM 1% y

metanol 1%) y secada para proveer una resina naranja que fue negativa para la prueba de ninhidrina.

Procedimiento general para el clivado y desprotección de péptido unido a resina

Los péptidos pueden ser clivados de la resina por agitación durante 3 horas a temperatura ambiente en una mezcla de clivaje que consiste en TFA 80%, agua 5%, tioanisol 5%, fenol 5%, TIS 2,5%, y EDT 2,5% (1 mL/0,1 g de resina). La resina se puede eliminar por filtración y lavado dos veces con TFA. El TFA se puede evaporar de los filtrados, y precipitar el producto con éter (10 mL/0,1 g de resina), recuperado por centrifugación, lavado dos veces con éter (10 mL/0,1 g de resina) y secado para dar el péptido crudo.

Procedimiento general para la purificación de péptidos

Los péptidos crudos se pueden purificar en un sistema de HPLC preparativa Gilson usando un programa de computación para análisis Unipoint® (Gilson, Inc., Middleton, WI) en una columna de compresión radial que contiene dos segmentos de 25 x 100 mm empaquetados con partículas Delta-Pak™ C18 de 15 µm con tamaño de poro de 100 Å y eluídos con uno de los métodos de gradiente listados más abajo. Uno a dos mililitros de solución de péptido crudo (10 mg/mL en 90% DMSO/agua) se pueden purificar por inyección. Los picos que contienen el o los productos de cada corrida se pueden combinar y liofilizar. Todas las corridas preparativas se puede correr a 20 mL/min con eluyentes como solución amortiguadora A: 0,1% TFA-agua y solución amortiguadora B: acetonitrilo.

Procedimiento general para HPLC analítica

La HPLC analítica se puede realizar en un sistema Hewlett-Packard series 1200 con un detector de arreglo de diodos y un detector de fluorescencia Hewlett-Packard 1046A corriendo un programa de computación HPLC 3D ChemStation versión A.03.04 (Hewlett-Packard. Palo Alto, CA) en una columna YMC de 4,6 x 250 mm empaquetada con partículas ODS-AQ de 5 µm con un tamaño de poro de 120 Å y se eluyó con uno de los métodos de gradientes listados más abajo luego de preequilibrar con las condiciones iniciales durante 7 minutos. Los eluyentes pueden ser solución amortiguadora A: 0,1% TFA-agua y solución amortiguadora B: acetonitrilo. La tasa de flujo para todos los gradientes puede ser 1 mL/minuto.

F-Bak: Sonda peptídica: Acetil--(SEQ ID NO: 1)GQVGRQLAIIGDK(6-FAM)-(SEQ ID NO: 2) INR-NH_2.

La resina Fmoc-Rink amida MBHA puede ser extendida usando el procedimiento de síntesis peptídica general para proveer el péptido unido a resina protegido (1,020 g). El grupo Mtt puede ser eliminado, marcado con 6-FAM-NHS y clivado y desprotegido como se describe anteriormente en la presente para proveer el producto crudo como un sólido naranja (0,37 g). Este producto se puede purificar por RP-HPLC. Las fracciones a lo largo del pico principal se pueden ensayar por RP-HPLC analítica, y las fracciones puras se pueden aislar y liofilizar, con el pico principal proveyendo el compuesto del título (0,0802 g) como un sólido amarillo; MALDI-MS m/z = 2137,1 ($(M+H)^+$).

***Síntesis alternativa de la sonda peptídica F-Bak*: Acetil--(SEQ ID NO: 1) GQVGRQLAIIGDK(6-FAM)- -(SEQ ID NO: 2) INR-NH_2**

El péptido protegido puede ser ensamblado en una resina con 0,25 mmol

Fmoc-Rink amida MBHA (Novabiochem) en un sintetizador de péptidos automatizado Applied Biosystems 433A corriendo ciclos de acoplamiento Fastmoc™ usando cartuchos de 1 mmol de aminoácidos precargados, excepto para la lisina marcada con fluoresceína(6-FAM), en donde se puede pesar 1 mmol de Fmoc-Lys(4-metiltritil) en el cartucho. El grupo acetilo N-terminal se puede incorporar colocando 1 mmol de ácido acético en un cartucho y acoplar como se describe anteriormente en la presente. La eliminación selectiva del grupo 4-metiltritilo se puede lograr con una solución de 95:4:1 DCM:TIS:TFA (volumen/volumen/volumen) fluyendo a través de la resina durante 15 minutos, seguido por extinción con un flujo de dimetilformamida. El isómero simple de 6-carboxifluoresceína-NHS se puede hacer reaccionar con la cadena lateral de lisina en DIEA 1% en DMF y confirmar el final por la prueba de ninhidrina. El péptido se puede clivar de la resina y desproteger las cadenas laterales por tratamiento con 80:5:5:5:2.5:2.5 TFA:agua:fenol:tioanisol:triisopropilsilano: 3,6-dioxa-1,8-octaneditiol (volumen/volumen/volumen/volumen/volumen/volumen), y recuperar el péptido crudo por precipitación con éter dietílico. El péptido crudo se puede purificar por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa, y confirmar su pureza e identidad por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa analítica y por espectrometría de masa por desorción láser asistida por matriz (m/z = 2137,1 ($(M+H)^+$)).

Ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia con resolución temporal (TR-FRET)

Los compuestos representativos pueden ser diluidos serialmente en dimetilsulfóxido (DMSO) iniciando a 50 µM (2× concentración de partida; DMSO 10%) y transferidos 10 µL a una placa de 384 pocillos. Luego se pueden agregar 10 µL de

una mezcla proteína/sonda/anticuerpo a cada pocillo a concentraciones finales listadas en la tabla AA más abajo.

TABLA AA. Proteína, sonda y anticuerpo para usar en ensayos de TR-FRET

Proteína	**Sonda**	**Proteína (nM)**	**Sonda (nM)**	**Anticuerpo**	**Anticuerpo (nM)**
GST-Bcl-2	F-Bak(SEQ. ID. No. 1) (GQVGRQLAIIGDK(6-FAM) (SEQ ID No.2)INR-amida)	1	100	Tb-anti-GST	1
GST-Bcl-X_L	F-Bak(SEQ. ID. No. 1) (GQVGRQLAIIGDK(6-FAM) (SEQ ID No.2)INR-amida)	1	100	Tb-anti-GST	1

6-FAM = 6- carboxifluoresceína.; Tb = terbio; GST = glutatión S-transferasa

Las muestras luego se pueden mezclar en un agitador durante 1 minuto y ser incubadas durante 3 horas adicionales a temperatura ambiente. Para cada ensayo, la sonda/anticuerpo y proteína/sonda/anticuerpo puede ser incluido en cada placa de ensayo como controles negativo y positivo, respectivamente. La fluorescencia se puede medir en un Envision (Perkin Elmer) usando un filtro de excitación 340/35 nm y filtros de emisión 520/525 (péptido F-Bak) y 495/510 nm (anticuerpo anti-histidina marcado con Tb).

dd) Tratar, tratando o tratamiento

Los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento" como se usan en la presente hacen referencia a administrar uno o más agentes activos o compuestos a un sujeto

en un esfuerzo por (i) prevenir que ocurra una condición patológica (por ejemplo profilaxis); (ii) inhibir la condición patológica o detener su desarrollo; (iii) aliviar una condición patológica y/o prevenir o reducir la severidad de uno o más síntomas asociados con dicha condición patológica, sin importar de si alguno de los elementos (i) a (iii) son exitosos en un sujeto.

ee) Polinucleótido variante o secuencia de ácido nucleico variante

Un "polinucleótido variante" o una "secuencia de ácido nucleico variante" hace referencia a un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente 60% de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferentemente al menos aproximadamente 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% de identidad de secuencia de ácido nucleico y aún más preferentemente al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de ácido nucleico con una dada secuencia de ácido nucleico. Las variantes no abarcan las secuencias de nucleótidos nativos.

Ordinariamente, los polinucleótidos variantes tienen al menos aproximadamente 8 nucleótidos de longitud, con frecuencia al menos aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 nucleótidos de longitud, o incluso aproximadamente entre 75 y 200 nucleótidos de longitud, o más.

El área de los nucleótidos incluye derivados en donde la molécula de ácido nucleico ha sido modificada covalentemente por sustitución, química, enzimática, u otro medio apropiado con un grupo diferente de un nucleótido de origen natural.

B. inhibidores de proteínas de la familia Bcl-2

En un aspecto, la presente divulgación se relaciona con ciertos compuestos inhibidores de proteínas de la familia Bcl-2.

Los grupos variables de los compuestos en la presente están representados por identificadores (letras en mayúscula con valores numéricos y/o alfabéticos en superíndice) y se pueden realizar específicamente.

Se podrá comprender que se mantienen las valencias apropiadas para todas las porciones y combinaciones de los mismos, y que los grupos monovalentes con más de un átomo se unen por su extremo izquierdo.

También se podrá comprender que un aspecto específico de un grupo variable puede ser igual o diferente de otro aspecto específico que tiene al mismo identificador.

Los compuestos de esta divulgación pueden contener átomos de carbono sustituidos de manera asimétrica en la configuración R o S, en donde los términos "R" y "S" son como se definen en *Pure Appl. Chem.*(1976) 45, 13-10. Los compuestos que contienen átomos de carbono sustituidos de manera asimétrica con cantidades iguales de configuraciones R y S son racémicos en dichos átomos. A los átomos que contienen un exceso de una configuración ante la otra se les asigna la configuración en exceso, preferiblemente un exceso de aproximadamente 85%-90%, más preferiblemente un exceso de aproximadamente 95%-99% y aún más preferiblemente un exceso mayor que aproximadamente 99%. Por lo tanto, esta divulgación pretende abarcar mezclas racémicas y diastereoisómeros relativos y absolutos de los compuestos con los mismos.

Los compuestos de esta divulgación también pueden contener enlaces dobles carbono-carbono o enlaces dobles carbono-nitrógeno en la configuración Z o E, en

donde el término "Z" representa el mayor de los dos sustituyentes del mismo lado de un enlace doble carbono-carbono o carbono-nitrógeno y el término "E" representa el mayor de los dos sustituyentes en lados opuestos de un enlace doble carbono-carbono o carbono-nitrógeno. Los compuestos de esta divulgación también pueden existir como una mezcla de isómeros "Z" y "E".

Los compuestos de esta divulgación también pueden existir como tautómeros o mezclas en equilibrio de los mismos, en donde un protón de un compuesto se desplaza de un átomo a otro. Los ejemplos de tautómeros incluyen, pero en un sentido no limitativo, ceto-enol, fenol-ceto, oxima-nitroso, nitro-aci, imina-enamina y semejantes.

Los compuestos de la fórmula (II) que tienen porciones NH, C(O)OH, OH o SH pueden estar unidos a grupos formadores de profármacos. Las porciones formadoras de prodrogas se remueven mediante procesos metabólicos y liberan los compuestos que contienen a los grupos NH, C(O)OH, OH o SH liberados *in vivo*. Los profármacos son de utilidad para ajustar propiedades farmacocinéticas de los compuestos tales como solubilidad y/o carácter hidrofóbico, absorción en el tracto gastrointestinal, biodisponibilidad, penetración en tejidos y velocidad de depuración.

Los metabolitos de compuestos que tienen la fórmula (II), producidos por procesos metabólicos *in vitro* o *in vivo*, también pueden tener utilidad para tratar enfermedades asociadas con expresión de un miembro de la familia de proteínas antiproapoptótica tal como la proteína Bcl-X_L, proteína Bcl-2 o proteína Bcl-w.

Ciertos compuestos precursoras que pueden ser metabolizados *in vitro* o *in vivo* para formar compuestos que tienen la fórmula (II) también pueden tener utilidad para tratar enfermedades asociadas con la expresión de una proteína de la familia

antiproapoptótica tal como proteína Bcl-X_L, proteína Bcl-2 o proteína Bcl-w.

Los compuestos de la Fórmula (II) pueden existir como sales de adición ácida, sales de adición básica o zwiteriones. Las sales de los compuestos de la Fórmula (II) se preparan durante su aislamiento o después de su purificación. Las sales de adición ácida son aquellas que derivan de la reacción de un compuesto de la fórmula (II) con un ácido. Por consiguiente, se considera que las sales incluyendo las sales acetato, adipato, alginato, bicarbonato, citrato, aspartato, benzoato, bencensulfonato (besilato), bisulfato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, digluconato, formiato, fumarato, glicerofosfato, glutamato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, iodhidrato, lactobionato, lactato, maleato, mesitilensulfonato, metansulfonato, naftilensulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, fosfato, picrato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tricloroacético, trifluoroacético, para-toluensulfonato y undecanoato de los compuestos de la Fórmula (II) están incluidas en esta divulgación. Las sales de adición básica de los compuestos son aquellas que derivan de la reacción de los compuestos de la Fórmula (II) con el bicarbonato, carbonato, hidróxido o fosfato de cationes tales como litio, sodio, potasio, calcio y magnesio.

Los compuestos de la fórmula (II) se pueden administrar, por ejemplo, por vía bucal, oftálmica, oral, osmóticamente, parenteral (intramuscular, intraperintoneal, intraesternal, intravenosa, subcutánea), rectal, tópica, transdérmica, vaginal e intraarterial así como mediante intraarticular inyección, infusión, y localización en el cuerpo, tal como, por ejemplo, la vasculatura.

Las cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto de la fórmula (II) dependen del receptor del tratamiento, de la enfermedad tratada y de la severidad de

la misma, la composición que comprende a las mismas, el momento de la administración, la ruta de administración, la duración del tratamiento, potencia, velocidad de depuración y si se coadministra, o no, otra droga. La cantidad de un compuesto de la fórmula (II) usada para conformarla como una composición que será administrada diariamente a un paciente en una sola dosis o en dosis divididas comprende entre aproximadamente 0.03 y aproximadamente 200 mg/kg peso corporal. Las composiciones de dosis única contienen estas cantidades o una combinación de submúltiplos de las mismas.

Los compuestos de la Fórmula (II) se pueden administrar con o sin un excipiente. Los excipientes incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, materiales encapsulantes y aditivos tales como aceleradores de absorción, antioxidantes, aglutinantes, soluciones amortiguadoras, agentes de recubrimiento, agentes colorantes, diluyentes, agentes desintegrantes, emulsionantes, disolventes, rellenos, agentes saborizantes, humectantes, lubricantes, perfumes, conservantes, propelentes, agentes de liberación, agentes esterilizantes, edulcorantes, solubilizantes, agentes humectantes, mezclas de los mismos y semejantes.

Los excipientes para la preparación de las composiciones que comprenden un compuesto de la fórmula (II) para ser administradas por vía oral incluyen, pero en un sentido no limitativo, agar, ácido algínico, hidróxido de aluminio, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, 1,3-butilenglicol, carbómeros, aceite de castor, celulosa, acetato de celulosa, manteca de cacao, almidón de maíz, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, crospovidona, diglicéridos, etanol, etilcelulosa, laurato de etilo, oleato de etilo, ésteres de ácidos grasos, gelatina, aceite de germen, glucosa, glicerol, aceite de maní, hidroxipropilmetilcelulosa, isopropanol, solución salina isotónica, lactosa,

hidróxido de magnesio, estearato de magnesio, malta, manitol, monoglicéridos, aceite de oliva, aceite de maní, sales de fosfato de potasio, almidón de papa, povidona, propilenglicol, solución Ringer, aceite de cártamo, aceite de sésamo, carboximetilcelulosa sódica, sales de fosfato de sodio, laurilsulfato de sodio, sorbitol sódico, aceite de soja, ácido esteárico, estearilfumarato, sacarosa, tensioactivos, talco, tragacanto, alcohol tetrahidrofurfurílico, triglicéridos, agua, mezclas de los mismos y semejantes. Los excipientes para la preparación de composiciones que comprenden un compuesto de la fórmula (II) para ser administradas por vía oftálmica u oral incluyen, pero en un sentido no limitativo, 1,3 butilenglicol, aceite de castor, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, etanol, ésteres de ácidos grasos de sorbitano, aceite de germen, aceite de maní, glicerol, isopropanol, aceite de oliva, polietilenglicoles, propilenglicol, aceite de sésamo, agua, mezclas de los mismos y semejantes. Los excipientes para la preparación de composiciones que comprenden un compuesto de la fórmula (II) para ser administradas osmóticamente incluyen, pero en un sentido no limitativo, clorofluorohidrocarburos, etanol, agua, mezclas de los mismos y semejantes. Los excipientes para la preparación de composiciones que comprenden un compuesto de la fórmula (II) para ser administradas por vía parenteral incluyen, pero en un sentido no limitativo, 1,3 butandiol, aceite de castor, aceite de semilla de algodón, dextrosa, aceite de germen, aceite de maní, liposomas, ácido oleico, aceite de oliva, aceite de maní, solución Ringer, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de soja, U.S.P. o solución isotónica de cloruro de sodio, agua, mezclas de los mismos y semejantes. Los excipientes para la preparación de composiciones que comprenden un compuesto de la fórmula (II) para ser administradas por vía rectal o vaginal incluyen, pero en un sentido no limitativo, manteca de cacao, polietilenglicol,

cera, mezclas de los mismos y semejantes.

Esta divulgación también comprende métodos terapéuticos combinados para tratar condiciones de enfermedad que involucran crecimiento celular anormal y/o apoptosis desregulada, tal como cáncer, en un paciente que comprende administrarle una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto que tiene la fórmula (II) y una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de un agente terapéutico adicional y/o radiación ionizante.

Los métodos terapéuticos combinados incluyen administrar composiciones de un compuesto que tiene la fórmula (II) y uno o más de un agente terapéutico adicional o radiación ionizante a un paciente usando cualquier dosificación deseada y/o régimen de esquema.

Se espera que los compuestos que tienen la fórmula (II) sean útiles cuando se usan con agentes alquilantes, inhibidores de angiogénesis, anticuerpos, antimetabolitos, antimitóticos, antiproliferativos, antivirales, inhibidores de aurora quinasa, otros inhibidores de promotores de apoptosis (por ejemplo, Bcl-xL, Bcl-w y Bfl-1), activadores de la vía de muerte celular, inhibidores de Bcr-Abl quinasa, anticuerpos BiTE (unidores de células T biespecíficas), conjugados anticuerpo-droga, modificadores de respuesta biológica, inhibidores de quinasa dependientes de inhibidores de ciclina, inhibidores del ciclo celular, inhibidores de ciclooxigenasa-2, DVD, inhibidores del receptor homólogo del oncogén viral de leucemia (ErbB2), inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores de proteína de shock térmico (HSP)-90, inhibidores de histona deacetilasa (HDAC), inhibidores de terapias hormonales, inmunológicos, inhibidores de inhibidores de proteínas de la apoptosis (IAPs), antibióticos que se intercalan, inhibidores de quinasa, inhibidores de quinesina,

030270

inhibidores de Jak2, inhibidores de blancos mamíferos de rapamicina, microARN, inhibidores de quinasa regulada por señal extracelular activada por mitógeno, proteínas de unión multivalentes, drogas antiinflamatorias no esteroides (NSAID), inhibidores de la polimerasa poliADP (adenosina difosfato)-ribosa polimerasa (PARP), quimioterapéuticos de platino, inhibidores de quinasas similar a polo (Plk), inhibidores de fosfoinosítido-3 quinasa (PI3K), inhibidores del proteosoma, análogos de purina, análogos de pirimidina, inhibidores del receptor de tirosina quinasa, alcaloides vegetales etinoides/deltoides, ácidos ribonucleicos pequeños inhibitorios (ARNpi), inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de ubiquitina ligasa, y similares, y en combinación con uno o más de estos agentes.

Los anticuerpos BiTE son anticuerpos biespecíficos que dirigen las células T para que ataquen a las células cancerosas mediante la unión simultánea de ambas células. Posteriormente, la célula T ataca la célula cancerosa blanco. Los ejemplos de anticuerpos BiTE incluyen adecatumumab (Micromet MT201), blinatumomab (Micromet MT103) y semejantes. Sin limitar la invención a una teoría, uno de los mecanismos a través de los cuales la célula T provoca la apoptosis de la célula cancerosa blanco es por medio de la exocitosis de los componentes de los gránulos citolíticos, que incluyen la perforina y la granzima B. Con relación a esto, se ha demostrado que Bcl-2 atenúa la inducción de la apoptosis mediada por la perforina y por la granzima B. Estos datos reflejan que mediante la inhibición de Bcl-2 sería posible potenciar los efectos citotóxicos provocados por las células T dirigidos contra las células cancerosas (V.R. Sutton, D.L. Vaux and J.A. Trapani, *J. of Immunology* **1997**, 158 (12), 5783).

Los ARNpi son moléculas que tienen las bases endógenas del ARN o

nucleótidos modificados por medios químicos. Las modificaciones no anulan la actividad en las células, sino que les confieren una estabilidad incrementada y/o una potencia incrementada en la célula. Los ejemplos de modificaciones químicas incluyen los grupos fosforotioato, los 2'-desoxinucleótidos, los ribonucleótidos que contienen 2'-OCH_3-, los 2'-F-ribonucleótidos, los 2'-metoxietil ribonucleótidos, las combinaciones de los anteriores y semejantes. El ARNpi puede tener longitudes variables (por ejemplo, de 10-200 bps) y estructuras variables (por ejemplo, horquillas, cadenas individuales/dobles, abultamientos, cotes/espacios, faltas de coincidencia) y es procesado en las células para proveer el silenciamiento activo de los genes. Un ARNpi de cadena doble (ARNcd) puede tener la misma cantidad de nucleótidos en cada cadena (extremos romos) o puede tener extremos asimétricos (salientes). La saliente de 1-2 nucleótidos puede estar presente en la cadena en el sentido del marco de lectura y/o en la cadena antisentido, y también puede estar presente en los extremos 5' y/o 3' de una cadena dada. Por ejemplo, se ha mostrado que los ARNpi dirigidos contra Mcl-1 potencian la actividad de ABT-263, (es decir, N-(4-(4-((2-(4-clorofenil)-5,5-dimetil-1-ciclohex-1-en-1-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(morfolin-4-il)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-((trifluorometil)sulfonil)bencensulfonamida) o ABT-737 (es decir, N-(4-(4-((4'-cloro(1,1'-bifenil)-2-il)metil)piperazin-1-il)benzoil)-4-(((1R)-3-(dimetilamino)-1-((fenilsulfanil)metil)propil)amino)-3-nitrobencensulfonamida) en líneas de células de tumor múltiples (Tse et. al (2008) *Cancer Research.* 68(9): 3421 y referencias allí).

Las proteínas de unión multivalentes son proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión al antígeno. Las proteínas de unión multivalentes son diseñadas de manera que tengan tres o más sitios de unión al antígeno y

generalmente no son anticuerpos naturales. El término "proteína de unión multivalente" hace referencia a una proteína de unión que es capaz de unirse a dos o más blancos relacionados o no relacionados. Las proteínas de unión con dos dominios variables (DVD) son proteínas de unión tetravalentes o multivalentes que comprenden dos o más sitios de unión al antígeno. Estas DVD pueden ser monoespecíficas (es decir, capaces de unirse a un antígeno) o multiespecíficas (es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos). Las proteínas de unión DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de las cadenas pesadas y dos polipéptidos DVD de las cadenas livianas se conocen como Ig DVD. Cada mitad de una Ig DVD comprende un polipéptido DVD de la cadena pesada, un polipéptido DVD de la cadena liviana y dos sitios de unión al antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena liviana, con la participación de un total de 6 CDR en la unión al antígeno por sitio de unión al antígeno.

Entre los agentes alquilantes se incluyen altretamina, AMD-473, AP-5280, apazicuona, bendamustina, brostalicina, busulfano, carbocuona, carmustina (BCNU), clorambucilo, CLORETAZINE® (laromustina, VNP 40101M), ciclofosfamida, decarbazina, estramustina, fotemustina, glufosfamida, ifosfamida, KW-2170, lomustina (CCNU), mafosfamida, melfalano, mitobronitol, mitolactol, nimustina, N-óxido mostaza nitrogenada, ranimustina, temozolomida, tiotepa, TREANDA® (bendamustina), treosulfano, rofosfamida y similares.

Entre los inhibidores de angiogénesis se incluyen inhibidores del receptor de tirosina quinasa específico de endotelio (Tie--2), inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), inhibidores del receptor del factor de crecimiento insulínico-2 (IGFR-2), inhibidores de metalproteinasa de matriz-2 (MMP-2), inhibidores

de metalproteinasa de matriz-9 (MMP-9), inhibidores del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), análogos de trombospondina, inhibidores del receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGFR) y similares.

Los antimetabolitos incluyen ALIMTA® (pemetrexed disódico, LY231514, MTA), 5-azacitidina, XELODA® (capecitabina), carmofur, LEUSTAT® (cladribina), clofarabina, citarabina, ocfosfato de citarabina, arabinósido de citosina, decitabina, deferoxamina, doxifluridina, eflornitina, EICAR, (5-etinil-1- -D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida), enocitabina, etinilcitidina, fludarabina, 5-fluorouracilo sólo o en combinación con leucovorina, GEMZAR® (gemcitabina), hidroxiurea, ALKERAN® (melfalán), mercaptopurina, 6-mercaptopurina ribósido, metotrexato, ácido micofenólico, nelarabina, nolatrexed, ocfosfato, pelitrexol, pentostatina, raltitrexed, Ribavirina, triapina, trimetrexato, S-1, tiazofurina, tegafur, TS-1, vidarabina, UFT y semejantes.

Los antivirales incluyen a ritonavir, hidroxicloroquina y similares.

Los inhibidores de la Bcr-Abl quinasa incluyen DASATINIB® (BMS-354825), GLEEVEC® (imatinib) y semejantes.

Los inhibidores de CDK incluyen AZD-5438, BMI-1040, BMS-032, BMS-387, CVT-2584, flavopiridol, GPC-286199, MCS-5A, PD0332991, PHA-690509, seliciclib (CYC-202, R-roscovitina), ZK-304709 y semejantes.

Entre los inhibidores de la COX-2 se incluyen ABT-963, ARCOXIA® (etoricoxib), BEXTRA® (valdecoxib), BMS347070, CELEBREX® (celecoxib), COX--189 (lumiracoxib), CT-3, DERAMAXX® (deracoxib), JTE-522, 4-metil-2-(3,4-dimetilfenil)-1-(4-sulfamoilfenil-1H-pirrol), MK--663 (etoricoxib), NS-398, parecoxib, RS-57067, SC--58125, SD-8381, SVT--2016, S-2474, T-614, VIOXX® (rofecoxib) y similares.

Los inhibidores de EGFR incluyen ABX-EGF, anti-EGFR inmunoliposomas, vacuna EGF, EMD-7200, ERBITUX® (cetuximab), HR3, anticuerpos IgA, IRESSA® (gefitinib), TARCEVA® (erlotinib o OSI-774), TP-38, proteína de fusión EGFR, TYKERB® (lapatinib) y similares.

Entre los inhibidores de ErbB2 se incluyen CP-724-714, CI-1033 (canertinib), Herceptin® (trastuzumab), TYKERB® (lapatinib), OMNITARG® (2C4, petuzumab), TAK--165, GW--572016 (ionafarnib), GW--282974, EKB-569, PI-166, dHER2 (vacuna HER2), APC--8024 (vacuna HER-2), anticuerpo biespecífico anti-HER/2neu, B7.her2IgG3, anticuerpos biespecíficos trifuncionales AS HER2, anticuerpo monoclonal AR-209, anticuerpo monoclonal 2B-1 y similares.

Los inhibidores de histona desacetilasa incluyen depsipéptido, LAQ-824, MS-275, trapoxina, ácido hidroxámico suberoilanilida (SAHA), TSA, ácido valproico y semejantes.

Los inhibidores de HSP-90 incluyen 17-AAG-nab, 17-AAG, CNF-101, CNF-1010, CNF-2024, 17-DMAG, geldanamicina, IPI-504, KOS-953, MYCOGRAB®, (anticuerpo recombinante humano para HSP-90), NCS-683664, PU24FCl, PU-3, radicicol, SNX-2112, STA-9090 VER49009 y semejantes.

Los inhibidores de proteínas de apoptosis incluyen a HGS-1029, GDC-0145, GDC-0152, LCL-161, LBW-242 y similares.

Los conjugados anticuerpo droga incluyen a anti-CD22-MC-MMAF, anti-CD22-MC-MMAE, anti-CD22-MCC-DM1, CR-011-vcMMAE, PSMA-ADC, MEDI-547, SGN-19Am, SGN-35, SGN-75 y similares.

Los activadores de la vía de receptor de muerte incluyen a TRAIL y anticuerpos u otros agentes que tienen como objetivo a TRAIL o a receptores de muerte (por

ejemplo, DR4 y DR5) tales como apomab, conatumumab, ETR2-ST01, GDC0145 (lexatumumab), HGS-1029, LBY-135, PRO-1762 y trastuzumab.

Los inhibidores de quinesina incluyen a inhibidores de Eg5 tales como AZD-4877 y ARRY-520, inhibidores de CENPE tales como GSK-923295A, y similares.

Los inhibidores de JAK2 incluyen a CEP-701 (lesaurtinib), XL019, INCB-018424 y similares.

Los inhibidores de MEK incluyen ARRY-142886, ARRY-438162 PD-325901, PD-98059 y semejantes.

Los inhibidores de mTOR incluyen a AP-23573, CCI-779, everolimus, RAD-001, rapamicina, temsirolimus, inhibidores de TORC1/TORC2 ATP-competitivos, incluyendo a PI-103, PP242, PP30 y Torina 1, y similares.

Las drogas antiinflamatorias no esteroides incluyen AMIGESIC® (salsalato), DOLOBID® (diflunisal), MOTRIN® (ibuprofeno), ORUDIS® (ketoprofeno), RELAFEN® (nabumetona), FELDENE® (piroxicam) crema ibuprofeno, ALEVE® y NAPROSYN® (naproxeno), VOLTAREN® (diclofenac), INDOCIN® (indometacina), CLINORIL® (sulindac), TOLECTIN® (tolmetin), LODINE® (etodolac), TORADOL® (ketorolac), DAYPRO® (oxaprozina) y semejantes.

Los inhibidores de PDGFR incluyen C-451, CP-673, CP-868596 y semejantes.

Los quimioterapéuticos de platino incluyen cisplatino, ELOXATIN® (oxaliplatino) eptaplatino, lobaplatino, nedaplatino, PARAPLATIN® (carboplatino), satraplatino, picoplatino y semejantes.

Los inhibidores de quinasa del tipo polo incluyen BI-2536 y semejantes.

Los inhibidores de fosfoinositida-3 (PI3K) quinasa incluyen a wortmanina, LY-294002, XL-147, CAL-120, ONC-21, AEZS-127, ETP-45658, PX-866, GDC-0941,

BGT226, BEZ235, XL765 y similares.

Los análogos de trombospondina incluyen ABT--510, ABT--567, ABT-898, TSP-1 y semejantes.

Los inhibidores de VEGFR incluyen AVASTIN® (bevacizumab), ABT-869, AEE-788, ANGIOZYME™ (una ribozima que inhibe la angiogénesis (Ribozyme Pharmaceuticals (Boulder, CO.) y Chiron (Emeryville, CA)), axitinib (AG-13736), AZD-2171, CP-547,632, IM-862, MACUGEN (pegaptamib), NEXAVAR® (sorafenib, BAY43-9006), pazopanib (GW-786034), vatalanib (PTK-787, ZK-222584), SUTENT® (sunitinib, SU-11248), trampa de VEGF, ZACTIMA™ (vandetanib, ZD-6474) y semejantes.

Los antibióticos incluyen los antibióticos intercalantes aclarubicina, actinomicina D, amrubicina, anamicina, adriamicina, BLENOXANE® (bleomicina), daunorubicina, CAELYX® o MYOCET® (doxorrubicina liposomal), elsamitrucina, epirbucina, glarbuicina, ZAVEDOS® (idarubicina), mitomicina C, nemorubicina, neocarzinostatina, peplomicina, pirarubicina, rebecamicina, Stimalamer, estreptozocina, VALSTAR® (valrubicina), zinostatina y semejantes.

Los inhibidores de topoisomerasa incluyen aclarubicina, 9-aminocamptotecina, amonafida, amsacrina, becatecarina, belotecán, BN-80915, CAMPTOSAR® (clorhidrato de irinotecán), camptotecina, CARDIOXANE® (dexrazoxina), diflomotecán, edotecarina, ELLENCE® o PHARMORUBICIN® (epirubicina), etopósido, exatecán, 10-hidroxicamptotecina, gimatecán, lurtotecán, mitoxantrona, oratecina, pirarubicina, pixantrona, rubitecán, sobuzoxan, SN-38, taflupósido, topotecán y semejantes.

Los anticuerpos incluyen a AVASTIN® (bevacizumab), anticuerpos específicos para CD40, chTNT-1/B, denosumab, ERBITUX® (cetuximab), Humax-CD4®

(zanolimumab), anticuerpos específicos para IGF1R, lintuzumab, PANOREX® (edrecolomab), RENCAREX® (WX G250), RITUXAN® (rituximab), ticilimumab, trastuzimab, anticuerpos para CD20 de tipo I y II y similares.

Las terapias hormonales incluyen ARIMIDEX® (anastrozol), AROMASIN® (exemestano), arzoxifeno, CASODEX® (bicalutamida), CETROTIDE® (cetrorelix), degarelix, deslorelina, DESOPAN® (trilostano), dexametasona, DROGENIL®, (flutamida), EVISTA® (raloxifeno), AFEMA™ fadrozol, FARESTON® (toremifeno), FASLODEX® (fulvestranto),FEMARA®, (letrozol), formestano, glucocorticoides, HECTOROL® o RENAGEL® (doxercalciferol), lasofoxifeno, acetato de leuprolida, MEGACE® (megesterol), MIFEPREX® (mifepristona), NILANDRON™ (nilutamida), NOLVADEX® (citrato de tamoxifen), PLENAXIS™ (abarelix), predisona, PROPECIA® (finasterida), rilostano, SUPREFACT® (buserelina), TRELSTAR® (hormona de liberación de la hormona luteinizante (LHRH)), VANTAS® (implante de histrelina), VETORYL®, (trilostano o modrastano), ZOLADEX® (fosrelina, goserelina) y semejantes.

Los deltoides y retinoides incluyen seocalcitol (EB1089, CB1093), lexacalcitrol (KH1060), fenretinida, PANRETIN® (alitretinoina), ATRAGEN® (tretinoína liposómica), TARGRETIN® (bexaroteno), LGD-1550 y semejantes.

Los inhibidores de PARP incluyen a ABT-888, olaparib, KU-59436, AZD-2281, AG-014699, BSI-201, BGP-15, INO-1001, ONO-2231 y similares.

Los alcaloides vegetales incluyen, pero en un sentido no limitativo, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina y semejantes.

Los inhibidores de proteasoma incluyen VELCADE® (bortezomib), MG132, NPI-0052, PR-171 y semejantes.

Los ejemplos de sustancias inmunológicas incluyen interferones y otros agentes mejoradores del sistema inmune. Los interferones incluyen interferón alfa, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón beta, interferón gamma-1a, ACTIMMUNE® (interferón gamma-1b) o interferón gamma-n1, combinaciones de los mismos y semejantes. Otros agentes incluyen ALFAFERONE® ,(IFN-), BAM-002 (glutatión oxidado), BEROMUN® (tasonermina), BEXXAR® (tositumomab), CAMPATH® (alemtuzumab), CTLA4 (antígeno de linfocitos citotóxico 4), decarbazina, denileuquina, epratuzumab, GRANOCYTE® (lenograstim), lentinan, alpha interferón de leucocitos, imiquimod, MDX-010 (anti-CTLA-4), vacuna contra melanoma, mitumomab, molgramostim, MILOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina), NEUPOGEN® (filgrastim), OncoVAC-CL, OVAREX® (oregovomab), pemtumomab (Y-muHMFG1), PROVENGE® (sipuleucel-T), sargaramostima, sizofilán, teceleuquina, THERACYS® (bacilo de Calmette-Guerin), ubenimex, VIRULIZIN® (inmunoterapéutico, Lorus Pharmaceuticals), Z-100 (sustancia específica de maruyama (SSM)), WF-10 (tetraclorodecaóxido (TCDO)), PROLEUKIN® (aldesleuquina), ZADAXIN® (timalfasin), ZENAPAX® (daclizumab), ZEVALIN® (90Y-Ibritumomab tiuxetano) y semejantes.

Los modificadores de la respuesta biológica son agentes que modifican los mecanismos de defensa de organismos vivientes o respuestas biológicas, tales como sobrevida, crecimiento o diferenciación de células de tejidos para dirigirlas hacia una actividad antitumoral e incluyen crestina, lentinano, sizofirano, picibanilo PF-3512676 (CpG-8954), ubenimex y similares.

Entre los análogos de pirimidina se incluyen citarabina (ara C o Arabinósido C), arabinósido de citosina, doxifluridina, FLUDARA® (fludarabina), 5-FU (5-fluorouracilo), floxuridina, GEMZAR® (gemcitabina), TOMUDEX® (raltitrexed), TROXATYL™

(triacetiluridina troxacitabina) y similares.

Los análogos de purina incluyen LANVIS® (tioguanina) y PURI-NETOL® (mercaptopurina).

Los agentes antimicóticos incluyen batabulina, epotilona D (KOS-862), N-(2-((4-hidroxifenil)amino)piridin-3-il)-4-metoxibencensulfonamida, ixabepilona (BMS 247550), paclitaxel, TAXOTERE® (docetaxel), PNU100940 (109881), patupilona, XRP-9881 (larotaxel), vinflunina, ZK-EPO (epotilona sintética) y semejantes.

Los inhibidores de ubiquitina ligasa incluyen a inhibidores de MDM2 tales como nutlinas, inhibidores de NEDD8 tales como MLN4924, y similares.

Los compuestos de esta divulgación también se pueden usar como radiosensibilizadores que mejoran la eficacia de una radioterapia. Los ejemplos de radioterapia incluyen radioterapia de haz externo, teleterapia, braquiterapia y radioterapia de fuente sellada, no sellada, y semejantes.

Además, los compuestos de la Fórmula (II) se pueden combinar con otros agentes quimioterapéuticos tales como ABRAXANE™ (ABI-007), ABT-100 (inhibidor de la farnesil transferasa), ADVEXIN® (vacuna de Ad5CMV-p53), ALTOCOR® o MEVACOR® (lovastatina), AMPLIGEN® (poli I:poli C12U, un ARN sintético), APTOSYN™ (exisulind), AREDIA® (ácido pamidrónico), arglabina, L-asparaginasa, atamestano (1-metil-3,17-dion-androsta-1,4-dieno), AVAGE® (tazaroteno), AVE-8062 (derivado de combreastatina), BEC2 (mitumomab), caquectina o caquexina (factor de necrosis tumoral), canvaxina (vacuna), CEAVAC™ (vacuna contra cáncer), CELEUK® (celmoleuquina), CEPLENE® (diclorhidrato de histamina), CERVARIX™ (vacuna

contra el papilomavirus humano), CHOP® (C: CYTOXAN® (ciclofosfamida); H: ADRIAMYCIN® (hidroxidoxorubicina); O: Vincristina (ONCOVIN®); P: prednisona), CyPat™ (acetato de ciproterona), combrestatina A4P, DAB(389)EGF (dominios catalítico y de traslocación de la toxina de la difteria fusionados por medio de un ligador His-Ala al factor de crecimiento epidérmico humanó) o TransMID-107R™ (toxinas de la difteria), dacarbazina, dactinomicina, ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético (DMXAA), eniluracilo, EVIZON™ (lactato de esqualamina), DIMERICINE® (loción liposomal T4N5), discodermolida, DX-8951f (mesilato de exatecan), enzastaurina, EPO906 (epitilona B), GARDASIL® (vacuna recombinante cuadrivalente contra el papilomavirus humano (Tipos 6, 11, 16, 18)), GASTRIMMUNE®, GENASENSE®, GMK (vacuna con gangliósidos conjugados), GVAX® (vacuna contra cáncer de próstata), halofuginona, histerelina, hidroxicarbamida, ácido ibandrónico, IGN-101, IL-13-PE38, IL-13-PE38QQR (cintredequina besudotox), IL-13-exotoxina de pseudomonas, interferón-α, interferón-γ, JUNOVAN™ o MEPACT™ (mifamurtida), lonafarnib, 5,10-metilentetrahidrofolato, miltefosina (hexadecilfosfocolina), NEOVASTAT®(AE-941), NEUTREXIN® (trimetrexato glucuronato), NIPENT® (pentostatina), ONCONASE® (una enzima ribonucleasa), ONCOPHAGE® (tratamiento con vacuna para melanoma), ONCOVAX® (vacuna de IL--2), ORATHECIN™ (rubitecano), OSIDEM® (droga celular en base a anticuerpos), OVAREX® MAb (anticuerpo monoclonal murino), paclitaxel, PANDIMEX™ (saponinas aglicona de ginseng que comprende 20(*S*)protopanaxadiol (aPPD) y 20(*S*)protopanaxatriol (aPPT)), panitumumab, PANVAC®-VF (vacuna contra el cáncer en investigación), pegaspargasa, PEG Interferón A, fenoxodiol, procarbazina, rebimastato, REMOVAB® (catumaxomab), REVLIMID® (lenalidomida), RSR13 (efaproxiral), SOMATULINE® LA

(lanreotido), SORIATANE® (acitretina), estaurosporina (*Streptomyces staurospores*), talabostat (PT100), TARGRETIN® (bexaroteno), TAXOPREXIN® (DHA-paclitaxel), TELCYTA™ (canfosfamida, TLK286), temilifeno, TEMODAR® (temozolomida), tesmilifeno, talidomida, THERATOPE® (STn-KLH), timitaq (diclorhidrato de 2-amino-3,4-dihidro-6-metil-4-oxo-5-(4-piridiltio)quinazolina), TNFERADE™ (adenovector: vehículo de ADN que contiene el gen para el factor de necrosis tumoral-α), TRACLEER® o ZAVESCA® (bosentano), tretinoína (Retin-A), tetrandrina, TRISENOX® (trióxido de arsénico), VIRULIZIN®, ukraína (derivado de alcaloides de la planta *Celidonia*), vitaxina (anticuerpo anti-alfavbeta3), XCYTRIN® (motexafin gadolinio), XINLAY™ (atrasentano), XYOTAX™ (paclitaxel poliglumex), YONDELIS™ (trabectedina), ZD-6126, ZINECARD® (dexrazoxan), ZOMETA® (ácido zolendrónico), zorubicina y similares.

Los péptidos BAX y BAD se informan en Zhang, H. C., Nimmer, P., Rosenberg, S. H., Ng, S. C., y Joseph, M. (2002). Development of a High-Throughput Fluorescence Polarization Assay for Bcl-x(L). *Analytical Biochemistry* 307, 70-75.

La afinidad de unión de compuestos que tienen la fórmula (II) por la proteína Bcl-X_L es indicio de su inhibición de la actividad de esta proteína. Para determinar la afinidad de unión de compuestos que tienen la fórmula (II) por la proteína Bcl-X_L, los ejemplos representativos se diluyeron en DMSO a concentraciones entre 100 µM y 1 pM y se agregaron a cada pocillo de una placa para microtitulación de 96 pocillos. Una mezcla comprendiendo 125 µL por pocillo de solución amortiguadora de ensayo (solución amortiguadora fosfato 20 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, PF-68 0,05%), 6 nM de proteína Bcl-X_L (preparadas como se describe en *Science* 1997, 275, 983-986), péptido BAD marcado con fluoresceína 1 nM (preparada casera) y la solución en DMSO del

compuesto se agitaron durante 2 minutos y se colocó en un LJL Analyst (LJL Bio Systems, CA). Se usaron un control negativo (DMSO, péptido BAD 15 nM, solución de ensayo) y un control positivo (DMSO, péptido BAD 1 nM, Bcl-X_L 6 nM, solución de ensayo) para determinar el rango del ensayo. La polarización se midió a temperatura ambiente usando una lámpara de fluoresceína continua (excitación 485 nm, emisión 530 nm). El porcentaje de inhibición se determinó por (1-((valor mP del pocillo-negativo control)/rango)) × 100%. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

La afinidad de unión de compuestos que tienen la fórmula (II) a la proteína Bcl-2 es indicio de su inhibición de la actividad de esta proteína. Para determinar la afinidad de unión de compuestos que tienen la fórmula (II) a Bcl-2, se diluyeron ejemplos representativos en DMSO a concentraciones entre 10 μM y 10 pM y se agregó a cada pocillo de una placa para microtitulación de 96 pocillos. Se agitó una mezcla que comprende 125 L por pocillo de solución amortiguadora para ensayo (solución fosfato amortiguadora 20 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, PF-68 0,05%), 10 nM de proteína Bcl-2 (preparada de acuerdo al procedimiento descripto en *PNAS* 2001, 98, 3012 - 3017), péptido BAX marcado con fluoresceína 1 nM (preparado casero) y la solución de DMSO del ejemplo representativo se agitó durante 2 minutos y se colocó en un LJL Analyst (LJL Bio Systems, CA. Se midió la polarización a temperatura ambiente usando una lámpara para fluoresceína continua (excitación 485 nm, emisión 530 nm). Los resultados también se muestran en la tabla 1.

Estos datos demuestran la utilidad de los compuestos que tienen la fórmula (II) como aglutinantes e inhibidores de la proteína antiapoptótica Bcl-X_L y antiapoptótica Bcl-2.

Se espera que, debido a que los compuestos que tienen la fórmula (II) se unen

e inhiben la actividad de Bcl-X_L y Bcl-2, también deberían tener utilidad como inhibidores de miembros de proteínas miembro de la familia antiapoptótica que tienen homología estructural cercana a Bcl-X_L y Bcl-2 tal como, por ejemplo, proteína antiapoptótica Bcl-w.

Por consiguiente, se espera que los compuestos que tienen la fórmula (II) tengan utilidad en el tratamiento de enfermedades durante las cuales se expresa la proteína antiapoptótica Bcl-X_L, proteína antiapoptótica Bcl-2, proteína antiapoptótica Bcl-w o una combinación de las mismas.

Determinación de eficacia celular en línea celular de tumor humano

Se plaquearon células de carcinoma de pulmón a células pequeñas NCI-H146 humanas (ATCC, Manassas, VA.) a 50.000 células por pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos en un volumen total de 100 µL de medio para cultivo tisular suplementado con 10% de suero humano (Invitrogen, Carlsbad, CA.) en lugar de suero fetal bovino y se trataron con una dilución seriada al medio de los compuestos de interés entre 10 µM y 0,020 µM. Se probó cada concentración por duplicado al menos 3 veces por separado. Se determinó el número de células viables después de 48 horas de tratamiento con compuesto usando el ensayo MTS de proliferación celular no radiactivo CellTiter 96® AQ_{ueous} de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Promega Corp., Madison, WI). Los resultados también se muestran en la Tabla 1.

Evaluación farmacocinética de compuestos seleccionados en rata

Se determinó el comportamiento farmacocinético de los compuestos de esta divulgación después de una dosis individual ihtravenosa de 2 mg/kg u oral de 5 mg/kg en ratas macho derivadas de Sprague-Dawley (n=3 por grupo). Los compuestos se prepararon como una solución de 2 mg/mL en una formulación con 10% DMSO en

PEG-400 tanto para la administración oral como intravenosa. La dosis intravenosa de 1 mL/kg se administró como un bolo lento (entre aproximadamente 1 y 2 minutos) en la vena yugular de una rata bajo anestesia leve con éter. La dosis oral se administró por alimentación forzada. Se obtuvieron muestras de sangre seriadas a partir de una vena de la cola de cada rata antes, 0,1 (IV solamente); 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8 y 24 horas después de la dosificación. Las muestras heparinizadas se mezclaron en forma exhaustiva y se colocaron en un baño de hielo. Se separó el plasma mediante centrifugación y se almacenó congelado antes de su análisis. Los resultados también se muestran en la Tabla 1.

Los compuestos de interés se separaron del plasma usando precipitación de proteínas con acetonitrilo. Se combinó una alícuota de plasma (entre 100 y 200 µL, muestra o estándar agregado) con 50 µL del estándar interno (análogo estructuralmente relacionado preparado en acetonitrilo) y 1 ml de acetonitrilo en una placa de 96 pocillos de polipropileno de pocillos profundos. Se agitaron las placas durante 30 segundos seguido por centrifugación (3500 rpm x 15 minutos, 4°C). De forma automática, se transfirió el sobrenadante a una placa limpia de 96 pocillos. Se evaporaron las muestras casi hasta sequedad en una Micro-Vap™ bajo una corriente de nitrógeno seco sobre calor suave (~37°C). Se reconstituyeron las muestras agitando en vórtex con 0,2 mL de DMSO al 5% en acetonitrilo. Se agregó una alícuota de entre 0,1 y 0,2 ml de acetonitrilo: 0,1% de ácido trifluoroacético (20:80, en volumen) a cada pocillo, seguido por mezclado en vórtex adicional de 30 segundos. Se centrifugaron las placas (3500 rpm x 15 minutos, 4°C) antes del análisis por HPLC-MS/MS. Se analizaron las muestras en simultáneo con plasma con agregado de estándar. Se analizaron todas las muestras de cada estudio como un lote individual en

el LC-MS/MS.

Los compuestos de interés y el estándar interno se separaron entre sí y se coextrajeron los contaminantes en una columna de 50 x 3 mm Keystone Betasil CN de 5 µm con una fase móvil de acetonitrilo: 0,1% de ácido trifluoroacético (50:50, en volumen) a una tasa de flujo de 0,7 ml/min. Se llevó a cabo el análisis en un Sciex API 300™ Biomolecular Mass Analyzer usando una interface de nebulizador calentado. Se determinaron las áreas de pico de los compuestos del título y los estándares internos usando el programa Sciex MacQuan™. Se derivaron curvas de calibración a partir de la proporción de áreas de pico (droga parental/estándar interno) de los plasmas de rata con estándar usando regresión lineal por cuadrados mínimos de la proporción versus la concentración teórica. Los métodos en general fueron lineales a lo largo de la curva estándar (coeficientes de correlación > 0,99) con un límite estimado de cuantificación de 0,01 µg/mL. Los datos de concentración en plasma para cada animal fueron sometidos a un ajuste de la curva multiexponencial usando WinNonlin. El área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo entre 0 y *t* horas (momento de la última concentración en plasma medible) después de la dosificación (AUC_{0-t}) se calculó usando la regla trapezoidal lineal para los perfiles de concentración en plasma-tiempo. El área residual extrapolado a infinito, determinada como la concentración en plasma medida final (C_t) dividido por la constante del índice de eliminación terminal (β), se agregó a la AUC_{0-t} para obtener el área total bajo la curva ($AUC_{0-\infty}$). Los resultados también se muestran en la Tabla 1. Los valores de Ki que se muestran en las tablas siguientes se determinaron usando la ecuación de Wang (Wang Z X, An Exact Mathematical Expression For Describing Competitive Binding Of Two Different Ligands To A Protein Molecule. *FEBS Lett.* 1995; 360:111-4).

TABLA 1

	Afinidad de unión a objetivo		Eficacia celular de NCI-H146	Área farmacocinética bajo la curva de concentración plasmática (rata)	Proporción PK/PD
Ejemplo	Ki (Bcl-2)	Ki (Bcl-X_L)	EC_{50}	$AUC_{0-\infty}$	AUC/EC_{50}
1	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0891 µM	5,01 µM	56
2	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0291 µM	7,01 µM	241
3	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0288 µM	4,13 µM	144
4	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0587 µM	6,34 µM	108
5	≤ 0,001	≤ 0,001	0,0388 µM	2,22 µM	57

	µM	µM			
6	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0010 µM	0,91 µM	91
7	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0589 µM	3,87 µM	66
8	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0212 µM	1,10 µM	52
9	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0137 µM	1,88 µM	137
10	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0342 µM	2,48 µM	73
11	≤ 0,002 µM	≤ 0,003 µM	0,0206 µM	2,40 µM	117
12	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0271 µM	2,07 µM	76

13	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0190 µM	2,06 µM	108
14	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0309 µM	3,42 µM	111
15	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0099 µM	1,25 µM	126
16	≤ 0,002 µM	≤ 0,002 µM	0,0374 µM	2,37 µM	63
17	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0287 µM	0,88 µM	31
18	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0154 µM	0,61 µM	40
19	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0158 µM	7,12 µM	451
20	≤	≤	0,0277 µM	3,11 µM	112

	0,001 µM	0,001 µM			
21	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0643 µM	1,81 µM	28
22	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0388 µM	4,08 µM	105
23	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0528 µM	3,54 µM	67
24	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0443 µM	8,04 µM	181
25	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0164 µM	1,67 µM	102
26	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0243 µM	0,80 µM	33
27	≤ 0,001	≤ 0,001	0,0185 µM	2,08 µM	112

	µM	µM			
28	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0242 µM	6,30 µM	260
29	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0298 µM	1,74 µM	58
30	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0317 µM	3,39 µM	107
31	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0130 µM	5,10 µM	392
32	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0187 µM	1,38 µM	73,9
33	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0378 µM	3,01 µM	79,8
34	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0200 µM	11,07 µM	554

35	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0076 µM	1,26 µM	166
36	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0242 µM	4,22 µM	174
37	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0175 µM	7,30 µM	417
38	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0394 µM	0,67 µM	17
39	≤ 0,001 µM	≤ 0,001 µM	0,0827 µM	1,66 µM	20

Los compuestos de la presente divulgación se compararon con compuestos que se divulgan en WO 2005/049594, que se identifican en la presente como Ejemplo A a L, mediante la determinación de la proporción de exposición sistémica a eficacia celular. Esta medida, a veces informada como AUC/EC_{50}, es bien conocida para personas con experiencia en el arte del descubrimiento de drogas farmacéuticas y desarrollo de drogas ya que es un útil predictor farmacodinámico de la eficacia oral.

Los ejemplos de la presente divulgación y los compuestos que se divulgan en

WO 2005/049594 se probaron ambos en un ensayo con células H146 y se evaluaron para propiedades farmacocinéticas orales en rata, en ambos casos como se describió previamente en la presente. Los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3. Como se puede ver en referencia a los datos, los compuestos de la presente divulgación tienen un perfil farmacodinámico más preferido (lo que significa que los compuestos de la presente invención exhiben mayores valores de AUC/EC_{50}) en comparación con los compuestos conocidos en el arte. A partir de estos resultados, se puede desprender un número de observaciones. Se puede observar que los compuestos que tienen un grupo NO_2 en la posición W^1 tienden a tener una potencia celular de buena a excelente (por ejemplo, EC_{50} < 1 μM). Sin embargo, cuando se determinan las propiedades farmacocinéticas de estos mismos compuestos, se puede ver que la exposición sistémica después de administración oral es baja, lo que resulta en proporciones de AUC/ EC_{50} de entre 0,5 y 19,7. Por otro lado, cuando se prueban los compuestos que tienen un grupo CF_3 o CN en la posición W^1 en el ensayo celular, estos derivados tienen una eficacia celular relativamente baja (por ejemplo, EC_{50} > 1 μM) aun cuando los mismos tienen una exposición sistémica adecuada después de la administración oral. Otra vez, esta combinación provee proporciones globales de AUC/EC_{50} de entre aproximadamente 2,8 y aproximadamente < 7,4. Sorprendentemente, los compuestos de la presente divulgación demuestran eficacia celular sobre pares con compuestos que tienen un grupo NO_2 mientras que mantienen la exposición sistémica adecuada después de la administración oral. Las proporciones AUC/EC_{50} resultantes para los compuestos de la divulgación son de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 554.

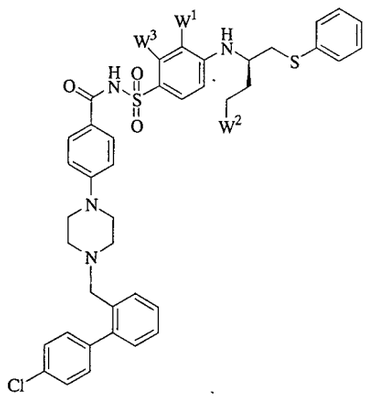

W1
W3
H
N
O
H
N
O
S
O
S
W2
N
N
Cl

Tabla 2

				Eficacia celular en NCI-H146	**Concentración plasmática farmacocinética pico** (rata)	**Área farmacocinética bajo la curva de concentración plasmática (rata)**	**Proporción PK/PD**
Ejemplo	W^1	W^2	W^3	H146, EC_{50}, (μM)	C_{max}, (μM)	AUC, (μM)	AUC/EC_{50}
38	SO_2CF_3	$N(CH_3)_2$	H	0,039	0,072	0,665	16,9
A	CF_3	$N(CH_3)_2$	H	1,599	0,371	4,412	2,8
B	NO_2	$N(CH_3)_2$	H	0,063	0,039	0,283	4,5
C	CN	$N(CH_3)_2$	H	1,807	0,315	1,917	1,1
D	CF_3	$N(CH_3)_2$	F	7,329	0,386	3,827	0,5
39	SO_2CF_3		H	0,083	0,290	1,657	20,0

E	NO_2		H	0,974	0,195	1,157	1,2
F	CF_3		H	> 1,00	0,592	7,365	<7,4

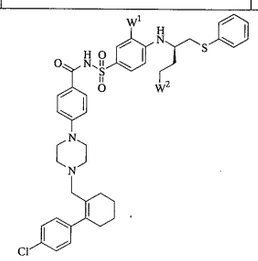


Tabla 3

			Eficacia celular en	**Concentración plasmática pico farmacocinética** (rata)	**Área farmacocinética bajo la curva de concentración**	**Proporción PK/PD**

			NCI-H146		**plasmática (rata)**	
Ejempl	W^1	W^2	H146 EC_{50}, (μM)	C_{max}, (μM)	AUC, (μM)	AUC/EC_{50}
18	SO_2CF_2Cl	$N(CH_3)_2$	0,015	0,059	0,609	39,5
26	SO_2CF_3	$N(CH_3)_2$	0,024	0,097	0,803	33,0
G	NO_2	$N(CH_3)_2$	0,026	0,057	0,507	19,7
H	CF_3	$N(CH_3)_2$	0,410	0,215	1,973	4,8
3	SO_2CF_2Cl		0,029	0,385	4,131	143,6
7	SO_2CF_3		0,059	0,518	3,867	65,6
I	NO_2		0,094	0,267	1,977	21,0
6	SO_2CF_2Cl		0,010	0,113	0,913	91,6

9	SO_2CF_3		0,014	0,156	1,878	137,5
J	NO_2		0,028	0,047	0,402	14,3
8	SO_2CF_3		0,021	0,071	1,098	51,7
K	NO_2		0,049	0,077	0,368	7,5
33	SO_2CF_3	N(*i*-Pr)CH_3	0,038	0,129	3,013	79,8
L	NO_2	N(*i*-Pr)CH_3	0,034	0,0367	0,615	18,2

i-Pr significa iso-propilo

Como se muestra en las Figuras 1 a 7, los estudios relacionados a la eficacia oral del Ejemplo 1 en combinación con etopósido, vincristina, CHOP, rituximab, rituximab con CHOP, rapamicina, y VELCADE demostraron que el Ejemplo 1 aumentó sinérgicamente la eficacia de estos agentes citotóxicos durante la terapia de combinación cuando se administraron por vía oral.

Además, las combinaciones que comprenden al Ejemplo 1 y vincristina resultaron en 10% de regresión tumoral completa.

Más aun, las combinaciones que comprenden al Ejemplo 1 y rituximab resultaron en 70% de regresión tumoral completa mientras que no se observaron regresiones tumorales para rituximab solo.

Más aun, las combinaciones que comprenden al Ejemplo 1 y rapamicina resultaron en 70% de regresión tumoral completa mientras que se observaron regresiones tumorales de 10% para rapamina sola.

Más aun, las combinaciones que comprenden al Ejemplo 1 y rituximab con CHOP resultaron en 90% de regresión tumoral completa mientras que se observaron regresiones tumorales de 10% para rituximab con CHOP solo.

Más aun, las combinaciones que comprenden al Ejemplo 1 y bortexomib resultaron en 10% de regresión tumoral completa mientras que no se observaron regresiones tumorales para bortexomib sola.

Las enfermedades durante las cuales se expresa proteína Bcl-XL anti apoptótica, proteína Bcl-2 anti apoptótica, proteína Bcl-w anti apoptótica o una combinación de las mismas, incluyen a, a título enunciativo no taxativo, cáncer y trastornos autoinmunes, en donde cáncer incluye a, a título enunciativo no taxativo, neuroma acústico, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica

000293

aguda (monocítica, mieloblástica, adenocarcinoma, angiosarcoma, astrocitoma, mielomonocítica y promielocítica), leucemia aguda a células T, carcinoma basal de células T, carcinoma de ducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, carcinoma broncogénico, cáncer de cérvix, condrosarcoma, cordoma, coriocarcinoma, leucemia crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, cáncer colorrectal, craniofaringioma, quistadenocarcinoma, linfoma difuso a células B grandes, cambios disproliferativos (displasias y metaplasias), carcinoma embrional, cáncer endometrial, endoteliosarcoma, ependimoma, carcinoma epitelial, eritroleucemia, cáncer de esófago, cáncer de mama positivo para receptor de estrógenos, trombocitopenia esencial, tumor de Ewing, fibrosarcoma, linfoma folicular, cáncer de testículo de célula germinal, glioma, enfermedad de cadenas pesadas, hemangioblastoma, hepatoma, cáncer hepatocelular, cáncer de próstata insensible a hormonas, leiomiosarcoma, liposarcoma, carcinoma de pulmón, linfagioendoteliosarcoma, linfangiosarcoma, leucemia linfoblástica, linfoma (de Hodgkin y de no Hodgkin), malignidades y trastornos hiperproliferativos de la vejiga, mama, colon, pulmón, ovarios, páncreas, próstata, piel y útero, malignidades linfoides de origen en células T o B, leucemia, linfoma, carcinoma de médula, meduloblastoma, melanoma, meningioma, mesotelioma, mieloma múltiple, leucemia mielogenosa, mieloma, mixosarcoma, neuroblastoma, cáncer de pulmón a células no pequeñas, oligodendroglioma, cáncer oral, sarcoma osteogénico, cáncer de ovario, cáncer pancreático, adenocarcinomas papilares, carcinoma papilar, pinealoma, policitemia vera, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma, carcinoma de glándula sebácea, seminoma, carcinoma de pulmón a células pequeñas, tumores

sólidos (carcinomas y sarcomas), carcinoma de células escamosas de cáncer de pulmón a células pequeñas, sinovioma, carcinoma de glándula sudorípara, macroglobulinemia de Waldenström, tumores de testículo, cáncer de útero y tumor de Wilms (*Cancer Res.*, 2000, 60, 6101 10 y Medicine, 2° Ed., J.B. Lippincott Co., Filadelfia (1985)); los trastornos autoinmunes incluyen a, a título enunciativo no taxativo, síndrome de enfermedad de inmunodeficiencia adquirida, síndrome linfoproliferativo autoinmune, anemia hemolítica, enfermedades inflamatorias, y trombocitopenia (*Current Allergy and Asthma Reports* 2003, 3:378-384; *Br. J. Haematol.* 2000 Sep; 110(3): 584-90; Blood 2000 Feb 15;95(4):1283-92; y *New England Journal of Medicine* 2004 Sep; 351(14): 1409-1418).

También se espera que los compuestos que tienen la fórmula (II) inhiban el crecimiento de células que derivan de un cáncer o neoplasma tal como cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama positivo para receptor de estrógenos), cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón a células pequeñas), linfoma (incluyendo folicular o difuso a células B grandes), linfoma (incluyendo linfoma de no Hodgkin), neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata (incluyendo cáncer de próstata insensible a hormonas), cáncer testicular (incluyendo cáncer testicular a células germinales).

También se espera que los compuestos que tienen la fórmula (II) inhiban el crecimiento de células que derivan de un cáncer o neoplasma pediátrico tal como rabdomiosarcoma embrional, leucemia linfoblástica aguda pediátrica, leucemia mielogenosa aguda pediátrica, rabdomiosarcoma alveolar pediátrico, ependimoma anaplásico pediátrico, linfoma a células grandes anaplásico pediátrico, meduloblastoma anaplásico pediátrico, tumor atípico teratoide/rabdoide pediátrico del

sistema nervioso central, leucemia aguda bifenotípica pediátrica, linfoma de Burkitt pediátrico, cáncer pediátrico de la familia de tumores de Ewing talas como tumores neuroectodermales primitivos, tumor de Wilm anaplásico difuso pediátrico, tumor de Wilm pediátrico con histología favorable, glioblastoma pediátrico, meduloblastoma pediátrico, neuroblastoma pediátrico, mielocitomatosis derivada de neuroblastoma pediátrico, cáncer de células pre B pediátrico (tales como leucemia), osteosarcoma pediátrico, tumor de riñón rabdoide pediátrico, rabdomiosarcoma pediátrico, y cáncer de células T pediátricos tales como linfoma y cáncer de piel (Solicitud de propiedad común de los EE.UU. No. de Serie 10/988.338), *Cancer Res.*, 2000, 60, 6101-10); los trastornos autoinmunes incluyen a, a título enunciativo no taxativo, síndrome de enfermedad de inmunodeficiencia adquirida, síndrome linfoproliferativo autoinmune, anemia hemolítica, enfermedades inflamatorias, y trombocitopenia (*Current Allergy and Asthma Reports* 2003, 3:378-384; *Br. J. Haematol.* 2000 Sep; 110(3): 584-90; Blood 2000 Feb 15;95(4):1283-92; y New England Journal of Medicine 2004 Sep; 351(14): 1409-1418).

Los compuestos que tienen la fórmula (II) se pueden hacer por procesos químicos sintéticos, ejemplos de los cuales se muestran a continuación. Se comprenderá que es posible variar el orden de los pasos en los procesos, que los reactivos, solventes y condiciones de reacción se pueden sustituir por los que se mencionan específicamente y que los grupos vulnerables se pueden proteger y desproteger, según necesidad.

Los grupos protectores para los grupos C(O)OH incluyen, pero en un sentido no limitativo, acetoximetilo, alilo, benzoilmetilo, bencilo, benciloximetilo, tert-butilo, tert-butildifenilsililo, difenilmetilo, ciclobutilo, ciclohexilo, ciclopentilo, ciclopropilo,

difenilmetilsililo, etilo, para-metoxibencilo, metoximetilo, metoxietoximetilo, metilo, metiltiometilo, naftilo, para-nitrobencilo, fenilo, n-propilo, 2,2,2-tricloroetilo, trietilsililo, 2-(trimetilsilil)etilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo, trifenilmetilo y semejantes.

Los grupos protectores para los grupos C(O) y C(O)H incluyen, pero en un sentido no limitativo, 1,3-dioxilcetal, dietilcetal, dimetilcetal, 1,3-dithianilcetal, O-metiloxima, O-feniloxima y semejantes.

Los grupos protectores para los grupos NH incluyen, pero en un sentido no limitativo, acetilo, alanilo, benzoilo, bencil(fenilmetilo), benzilideno, benciloxicarbonilo (Cbz), tert-butoxicarbonilo (Boc), 3,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, difenilmetilo, difenilfosforilo, formilo, metansulfonilo, para-metoxibenciloxicarbonilo, fenilacetilo, ftaloílo, succinilo, tricloroetoxicarbonilo, trietilsililo, trifluoroacetilo, trimetilsililo, trifenilmetilo, trifenilsililo, para-toluensulfonilo y semejantes.

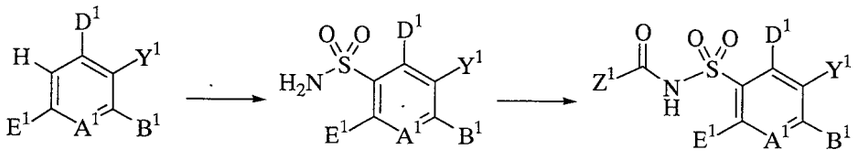
Los grupos protectores para grupos OH y SH incluyen, pero en un sentido no limitativo, acetilo, alilo, aliloxicarbonilo, benciloxicarbonilo (Cbz), benzoílo, bencilo, tert-butilo, tert-butildimetilsililo, tert-butildifenilsililo, 3,4-dimetoxibencilo, 3,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 1,1-dimetil-2-propenilo, difenilmetilo, formilo, metansulfonilo, metoxiacetilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, para-metoxibencilo, metoxicarbonilo, metilo, para-toluensulfonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetilo, trietilsililo, trifluoroacetilo, 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo, 2-trimetilsililetilo, trifenilmetilo, 2-(trifenilfosfonio)etoxicarbonilo y semejantes.

Las siguientes abreviaturas tienen los significados indicados.

ADDP significa 1,1'-(azodicarbonil)dipiperidina; AD-mix-β significa una mezcla de $(DHQD)_2PHAL$, $K_3Fe(CN)_6$, K_2CO_3 y K_2SO_4); AIBN significa 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo); 9-BBN significa 9-borabiciclo[3.3.1]nonano; $(DHQD)_2PHAL$ significa

hidroquinidina 1,4-ftalazinedil dietil éter; DBU significa 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno; DIBAL significa hidruro de diisobutilaluminio; DIEA significa diisopropiletilamina; DMAP significa N,N-dimetilaminopiridina; DME significa 1,2-dimetoxietano; DMF significa N,N-dimetilformamida; dmpe significa 1,2-bis(dimetilfosfino)etano; DMSO significa dimetilsulfóxido; dppb significa 1,4-bis(difenilfosfino)butano; dppe significa 1,2-bis(difenilfosfino)etano; dppf significa 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno; dppm significa 1,1-bis(difenilfosfino)metano; EDAC significa 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida; Fmoc significa fluorenilmetoxicarbonilo; HATU significa O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N'N'N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato; HMPA significa hexametilfosforamida; IPA significa isopropilo alcohol; LDA significa diisopropilamida de litio; LHMDS significa bis(hexametildisililamida) de litio; MP-BH_3 significa trietilamonio metilpoliestireno cianoborohidruro macroporoso; LAH significa hidruro de aluminio y litio; NCS significa N-clorosuccinimida; PyBOP significa benzotriazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato; TDA-1 significa tris(2-(2-metoxietoxi)etil)amina; TEA significa trietilamina; TFA significa ácido trifluoroacético; THF significa tetrahidrofurano; NCS significa N-clorosuccinimida; NMM significa N-metilmorfolina; NMP significa N-metilpirrolidina; PPh_3 significa trifenilfosfina.

Esquema 1

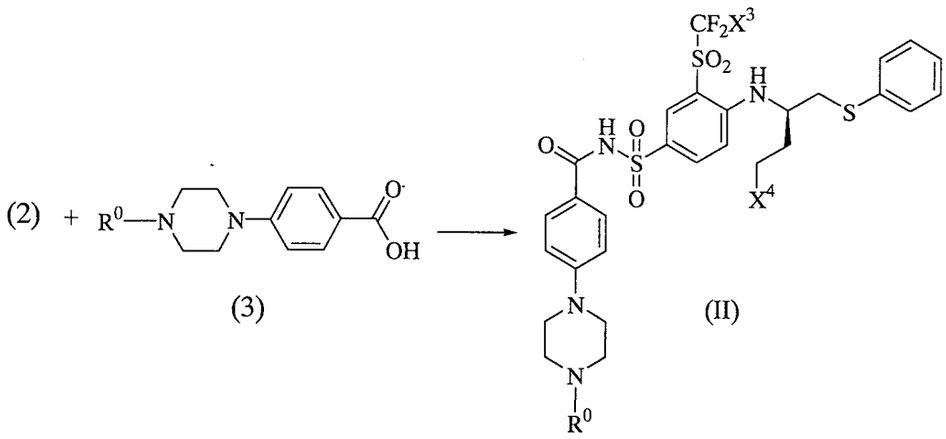


(1) (2) (I)

Como se muestra en el Esquema 1, los compuestos que tienen la fórmula (1) se pueden convertir a compuestos que tienen la fórmula (2) mediante reacción del

primero, ácido clorosulfónico, y amoníaco.

Esquema 2



Los compuestos que tienen la fórmula (2) se pueden convertir a los compuestos que tienen la fórmula (II) mediante reacción del primero y compuestos que tienen la fórmula (3) y un agente acoplante, con o sin una base. Los ejemplos de agente acoplantes incluyen a EDCI, CDI, y PyBop. Los ejemplos de bases incluyen a TEA, DIEA, DMAP, y mezclas de los mismos.

Los compuestos que tienen la fórmula (2) se pueden convertir a compuestos que tienen la fórmula (II) mediante reacción del primero y compuestos que tienen la fórmula Z^1-COCl y la base.

C. Combinaciones sinérgicas de agentes inductores de poliploidía e inhibidores de proteína de la familia de Bcl-2 para usar en tratamiento de cáncer

En otro aspecto, la presente divulgación se relaciona con el descubrimiento de combinaciones sinérgicas de agentes terapéuticos que son útiles para tratar pacientes que sufren de cáncer. Como se mencionó previamente en la presente, los inventores de la presente divulgación descubrieron que la inducción de poliploidización en ciertas

células tumorales y cancerígenas produce o hace que la supervivencia de estas células poliploides resultantes dependa de la actividad antiapoptótica de Bcl-X_L. Debido a que estas células poliploides ahora dependen de Bcl-X_L para su supervivencia, estas células tumorales y cancerígenas son sensibles a la inhibición de Bcl-X_L.

Por consiguiente, la presente divulgación se relaciona con una combinación de agentes terapéuticos (denominado, una terapia de combinación) que comprende (1) al menos un agente inductor de poliploidía; y (2) al menos un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2. El al menos un agente inductor de poliploidía puede ser un inhibidor de aurora quinasa (tal como un inhibidor de aurora quinasa B), un inhibidor de microtúbulos (tal como, por ejemplo, Taxotere, vincristina, nocodazol, paclitaxel o colcemid), un inhibidor panquinasa (tal como, por ejemplo, estaurosporina), un virus oncolítico (tal como, por ejemplo, ONYX-015), naranja de acridina, Dolastain-10, Noscapina, un inhibidor de topoisomerasa II (tal como, por ejemplo, ICRF-187 o ICRF-193), ácido 2-{4-[(7-cloro-2-quinoxalinil)oxi]fenoxi}propiónico, ácido 2-{4-[(7-bromo-2-quinolinil)oxi]fenoxi}propiónico, Platicodin D, un veneno de microtúbulos (tal como, por ejemplo, JG-03-14), un inhibidor de polimerización de actina (tal como, por ejemplo, Citochalasina B), Bistramida A o un antibiótico antitumoral (tal como, por ejemplo, Mitramicina SKI). Una agente inductor de poliploidía indicativo es un inhibidor de aurora quinasa. Un inhibidor de aurora quinasa indicativo que se puede usar es un inhibidor de aurora quinasa B. Los ejemplos de inhibidores de aurora quinasa B que se pueden usar incluyen a, a título enunciativo no taxativo, AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 y Hesperadina. Un inhibidor de aurora quinasa B indicativo que se puede usar es AZD1152.

Los métodos para determinar la inducción o evidencia de poliploidía en una o

más células se pueden obtener o determinar usando técnicas de rutina conocidas en el arte. Por ejemplo, la evidencia de poliploidía se puede determinar mediante detección de expresión elevada de p53. p53 es un indicador de poliploidización en las células que portan p53 de tipo salvaje (véase, Gizatullin, F. y col., "The Aurora Kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function," *Cancer Res.* 66, 7668-77. (2006)). Además, las células en las que se ha inducido poliploidía exhiben un contenido de ADN >4N, gran incremento morfológico de tamaño celular y multinucleasión, todo lo cual se puede detectar usando técnicas de rutina conocidas en el arte.

El al menos un inhibidor de miembro de la familia de Bcl-2 puede ser cualquiera de los compuestos que se describen en la Sección B de la presente (tales como, por ejemplo, ABT-263), ABT-737, inhibidores de Bcl-X_L (tales como A-1113567 y A-1182848) y combinaciones de los mismos. Un inhibidor de miembro de familia de Bcl-2 indicativo es ABT-263.

La combinación antes mencionada de agentes terapéuticos, o sea, el al menos un agente de poliploidía y el al menos un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2, se pueden usar para tratar a un paciente que sufre de al menos un tipo de cáncer. Específicamente, dichos métodos de tratamiento involucran administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente inductor de poliploidía y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 a un paciente que sufre de cáncer y que necesita de tratamiento para el mismo. El orden en que se administran el al menos un agente inductor de poliploidía y el al menos un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 al paciente no es crítico. Sin

embargo, debido a que las células tumorales y cancerígenas no se vuelven sensibles al inhibidor de proteína de la familia Bcl-2s hasta después de la inducción de la poliploidía, es más beneficiosos administrar la cantidad terapéuticamente eficaz del al menos un agente inductor de poliploidía al paciente antes de o subsiguientemente con la cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2.

La cantidad terapéuticamente eficaz del al menos un agente inductor de poliploidía y la cantidad terapéuticamente eficaz del al menos un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 a administrarse el paciente que se está tratando con la combinación de agentes terapéuticos que se describe en la presente puede determinarse fácilmente por parte de las personas con experiencia en el arte, o sea, el médico tratante.

Una combinación indicativa de agentes terapéuticos para usar en el tratamiento de un paciente que sufre de cáncer involucra el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de AZD1152 como el agente inductor de poliploidía y una cantidad terapéuticamente eficaz de ABT-263 como el inhibidor de proteína de la familia Bcl-2.

Las combinaciones que se describieron previamente de agentes terapéuticos se pueden administrar a un paciente que sufre de cualquier tipo de tumor, cáncer, malignidad o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la combinación de agentes terapéuticos se puede usar para tratar a un paciente que sufre de neuroma acústico, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (monocítica, mieloblástica, adenocarcinoma, angiosarcoma, astrocitoma, mielomonocítica y promielocítica), leucemia aguda a células T, carcinoma basal de células T, carcinoma

de ducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, carcinoma broncogénico, cáncer de cérvix, condrosarcoma, cordoma, coriocarcinoma, leucemia crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, cáncer colorrectal, craniofaringioma, quistadenocarcinoma, linfoma difuso a células B grandes, cambios disproliferativos (displasias y metaplasias), carcinoma embrional, cáncer endometrial, endoteliosarcoma, ependimoma, carcinoma epitelial, eritroleucemia, cáncer de esófago, cáncer de mama positivo para receptor de estrógenos, trombocitopenia esencial, tumor de Ewing, fibrosarcoma, linfoma folicular, cáncer de testículo de célula germinal, glioma, enfermedad de cadenas pesadas, hemangioblastoma, hepatoma, cáncer hepatocelular, cáncer de próstata insensible a hormonas, leiomiosarcoma, liposarcoma, carcinoma de pulmón, linfagioendoteliosarcoma, linfangiosarcoma, leucemia linfoblástica, linfoma (de Hodgkin y de no Hodgkin), malignidades y trastornos hiperproliferativos de la vejiga, mama, colon, pulmón, ovarios, páncreas, próstata, piel y útero, malignidades linfoides de origen en células T o B, leucemia, linfoma, carcinoma de médula, meduloblastoma, melanoma, meningioma, mesotelioma, mieloma múltiple, leucemia mielogenosa, mieloma, mixosarcoma, neuroblastoma, cáncer de pulmón a células no pequeñas, oligodendroglioma, cáncer oral, sarcoma osteogénico, cáncer de ovario, cáncer pancreático, adenocarcinomas papilares, carcinoma papilar, pinealoma, policitemia vera, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma, carcinoma de glándula sebácea, seminoma, carcinoma de pulmón a células pequeñas, tumores sólidos (carcinomas y sarcomas), carcinoma de células escamosas de cáncer de pulmón a células pequeñas , sinovioma, carcinoma de glándula sudorípara, macroglobulinemia de Waldenström, tumores de

testículo, cáncer de útero y tumor de Wilms (Cancer Res., 2000, 60, 6101 10 y Medicine, 2° Ed., J.B. Lippincott Co., Filadelfia (1985)).

D. Ensayos de polinucleótidos

En conexión con el descubrimiento que se describió previamente en la Sección C, los inventores de la presente divulgación también descubrieron que las células tumorales y cancerígenas (sin importar si estas células se han inducido para ser poliploides o no) y que contienen al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un gen NOXA humano, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano) y un gen NOXA humano son inmunes o exhiben resistencia al tratamiento con un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 después de la inducción de poliploidía con al menos un agente inductor de poliploidía. En otras palabras, las células tumorales y cancerígenas poliploides que contienen al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un gen NOXA humano, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano) y un gen NOXA humano no exhiben o experimentan apoptosis o muerte celular cuando se tratan simultáneamente o subsiguientemente con al menos un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2.

Por consiguiente, en vista de este descubrimiento, en otro aspecto, la presente divulgación provee métodos de ensayo de ácidos nucleicos para detectar la presencia o ausencia de al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un

gen NOXA humano, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano) y un gen NOXA humano mediante: (i) ensayos de hibridización *in situ* para muestras de tejido intacto o de células, (ii) ensayos de hibridización en microarreglos contra ADN cromosómico extraído de una muestra de tejido, y (iii) reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otro ensayo de amplificación para ADN cromosómico extraído de una muestra de tejido. También se pueden usar ensayos que usan análogos sintéticos de ácidos nucleicos, tales como ácidos nucleicos peptídicos, en cualquiera de estos formatos.

Los ensayos de la divulgación se usan para identificar al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un gen NOXA humano, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano) y un gen NOXA humano para usar tanto en predicción de respuesta a terapia como para monitorear la respuesta del paciente a la terapia con agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 o una combinación de terapia con agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteína de la familia Bcl-2. Los ensayos para predicción de respuesta se pueden correr antes de la administración de al menos un agente inductor de poliploidía (para inducir poliploidía) o después de la inducción de poliploidía pero antes de la administración de al menos un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2, y los pacientes que no muestran o se exhiben mostrando al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un gen NOXA humano, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano) y un

gen NOXA humano se considerarían elegibles para la terapia con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteína de la familia Bcl-2.

Para monitorear la respuesta del paciente, el ensayo se puede correr al inicio de la terapia (o sea en el momento de la administración de al menos un agente inductor de poliploidía o después de la administración de al menos un agente inductor de poliploidía pero antes de la administración de al menos un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2) para establecer los niveles basales de la(s) mutación(es) en la muestra de tejido, por ejemplo, el porcentaje de células totales o el número de células que muestran al menos una mutación en la muestra. Luego se muestrea el mismo tejido y se ensaya, y luego se comparan la cantidad y número de mutaciones con las basales o con el nivel predeterminado. Cuando el número de mutaciones permanece igual o disminuye, es probable que la terapia sea eficaz y que se pueda continuar. Cuando ocurre incremento significativo de las mutaciones sobre el nivel basal, el paciente puede no estar respondiendo o puede haber desarrollado resistencia a terapia continua con agente inductor de poliploidía, terapia con inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 o una terapia combinación de agente inductor de poliploidía y terapia con inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2.

Los ensayos de la divulgación se pueden usar con muestras para prueba que se obtienen de un paciente que sufre de tipos de cáncer tales como, a título enunciativo no taxativo, neuroma acústico, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (monocítica, mieloblástica, adenocarcinoma, angiosarcoma, astrocitoma, mielomonocítica y promielocítica), leucemia aguda a células T, carcinoma basal de células T, carcinoma de ducto biliar, cáncer de vejiga,

cáncer de cerebro, cáncer de mama, carcinoma broncogénico, cáncer de cérvix, condrosarcoma, cordoma, coriocarcinoma, leucemia crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, cáncer colorrectal, craniofaringioma, quistadenocarcinoma, linfoma difuso a células B grandes, cambios disproliferativos (displasias y metaplasias), carcinoma embrional, cáncer endometrial, endoteliosarcoma, ependimoma, carcinoma epitelial, eritroleucemia, cáncer de esófago, cáncer de mama positivo para receptor de estrógenos, trombocitopenia esencial, tumor de Ewing, fibrosarcoma, linfoma folicular, cáncer de testículo de célula germinal, glioma, enfermedad de cadenas pesadas, hemangioblastoma, hepatoma, cáncer hepatocelular, cáncer de próstata insensible a hormonas, leiomiosarcoma, liposarcoma, carcinoma de pulmón, linfagioendoteliosarcoma, linfangiosarcoma, leucemia linfoblástica, linfoma (de Hodgkin y de no Hodgkin), malignidades y trastornos hiperproliferativos de la vejiga, mama, colon, pulmón, ovarios, páncreas, próstata, piel y útero, malignidades linfoides de origen en células T o B, leucemia, linfoma, carcinoma de médula, meduloblastoma, melanoma, meningioma, mesotelioma, mieloma múltiple, leucemia mielogenosa, mieloma, mixosarcoma, neuroblastoma, cáncer de pulmón a células no pequeñas, oligodendroglioma, cáncer oral, sarcoma osteogénico, cáncer de ovario, cáncer pancreático, adenocarcinomas papilares, carcinoma papilar, pinealoma, policitemia vera, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma, carcinoma de glándula sebácea, seminoma, carcinoma de pulmón a células pequeñas, tumores sólidos (carcinomas y sarcomas), carcinoma de células escamosas de cáncer de pulmón a células pequeñas , sinovioma, carcinoma de glándula sudorípara, macroglobulinemia de Waldenström, tumores de testículo, cáncer de útero y tumor de

Wilms (*Cancer Res.*, 2000, 60, 6101-10).

Los ensayos de la invención se llevan a cabo sobre cualquier tipo de muestra de prueba, tal como una muestra de tejido de paciente de cualquier tipo a un derivado de las mismas, incluyendo sangre periférica, tejidos tumorales o sospechados de tumorales (incluyendo tejido recién congelado y fijado embebido en parafina), aislados de células tales como células epiteliales circulantes separadas o identificadas en una muestra de sangre, muestra de nódulo linfático, aspirados de medula ósea y con aguja fina.

La presente exposición comprende la detección de los biomarcadores genómicos mediante ensayos de hibridización que usan sondas a base de ácidos nucleicos marcados en forma detectable, tales como sondas de ácido deoxiribonucleico (ADN) o sondas de ácido nucleico proteico (PNA), o cebadores sin marcar que se diseñan/seleccionan para hibridizar con un blanco cromosómico específico. Los cebadores sin marcar se usan en ensayos de amplificación, tales como mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la que después de la unión de los cebadores, una polimerasa amplifica la secuencia de ácidos nucleicos objetivo para su subsiguiente detección. Las sondas de detección que se usan en PCR u otros ensayos de amplificación son preferentemente fluorescentes, y aún más preferentemente, sondas de detección útiles en "PCR a tiempo real". También se prefieren sondas fluorescentes para usar en hibridización *in situ* pero también se pueden usar otras marcas detectables que se usan comúnmente en técnicas de hibridización, por ejemplo, marcas enzimáticas, cromogénicas e isotópicas. Las técnicas útiles para el marcado de sondas se describen en la literatura (Fan, Y.-S. 2002. *Molecular cytogenetics: protocols and applications*. Human Press, Totowa, N.J.

xiv, p. 411, los contenidos de la cual se incorporan a la presente como referencia). En la detección de los biomarcadores genómicos mediante análisis por microarreglos, se aplican estas técnicas de marcado de sondas para marcar ADN cromosómico que se extrajo de una muestra de paciente, la que se hibridiza luego al microarreglo.

Preferentemente, se usa hibridización *in situ* para detectar la presencia o ausencia de al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un gen NOXA humano, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano) y un gen NOXA humano. Los ejemplos de genes para los que se detecta la presencia o ausencia de al menos una mutación son un gen BAX humano, un gen BAK humano, un gen NOXA humano y cualquier combinación de los mismos. Las sondas y cebadores los puede hacer una persona con experiencia en el arte usando técnicas de rutina en el arte o usando sondas tales como las que están disponibles en conjuntos de componentes comercialmente disponibles, tales como el E**nsayo de expresión TAQMAN® de Applied Biosystems** (Applied Biosystems, Foster City, CA) para detectar y/o determinar la expresión de los genes BAX, BAK y NOXA. Los ejemplos de **ensayos de expresión TAQMAN® de Applied Biosystems** disponibles de Applied Biosystems que se pueden usar se muestran más adelante en la Tabla 3.

Tabla 3

Gen	**ID del ensayo de expresión TAQMAN® de Applied Biosystems**

BAX	Hs99999001_m1
BAK	Hs00940250_g1
NOXA	Hs00560402_m1

Las sondas para usar en los métodos de hibridización *in situ* de la divulgación caen dentro de dos grupos amplios: sondas de enumeración cromosómica, o sea, sondas que hibridizan con una región cromosómica, usualmente una región de secuencia repetitiva, e indica la presencia o ausencia de un cromosoma entero; y sondas específicas de locus, o sea, sondas que hibridizan con un locus específico sobre un cromosoma y detectan la presencia o ausencia de un locus específico. Las sondas para brazos cromosómicos, o sea, sondas que hibridizan con una región cromosómica e indican la presencia o ausencia de un brazo de un cromosoma específico, también se pueden usar. Se prefiere usar una sonda específica de locus que pueda detectar cambios de las secuencias de ADN cromosómico únicas en el locus de interés, tales como, por ejemplo, uno o más de los loci de BAX, BAK y NOXA humanos. Los métodos para usar sondas de secuencia única para hibridización *in situ* se divulgan en la Patente de los EE.UU. No. 5.447.841, los contenidos de la cual se incorporan a la presente como referencia.

Una sonda de enumeración cromosómica puede hibridizar con una secuencia repetitiva, que se localiza o bien cerca o que se ha eliminado de un centrómero, o puede hibridizar con una secuencia única que se localiza en cualquier posición de un cromosoma. Por ejemplo, una sonda de enumeración cromosómica puede hibridizar con ADN repetitivo asociado con el centrómero de un cromosoma. Los centrómeros de cromosomas de primates contienen una familia compleja de repeticiones de ADN largas en tándem que comprenden una longitud de repetición de monómeros de

aproximadamente 171 pares de bases, que se denominan como ADN satélite alfa. Las sondas para hibridización *in situ* fluorescente de centrómeros para cada uno de los cromosomas 14 y 18 están disponibles comercialmente en Abbott Molecular (Des Plaines, IL).

Sondas excepcionalmente útiles para hibridización *in situ* son las sondas con marca fluorescente directa, tales como las que se describen en la Patente de los EE.UU. No. 5.491.224, que se incorpora a la presente como referencia. La Patente de los EE.UU. No. 5.491.224 también describe ensayos de FISH simultáneos que usan más de una sonda marcada fluorescentemente.

Las sondas específicas de locus que son útiles se pueden producir de cualquier forma y en general contienen secuencias que hibridizan con una secuencia blanco de ADN cromosómico de entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 1.000.000 de bases de longitud. Preferentemente la sonda hibridiza con un sector objetivo de ADN cromosómico en el locus objetivo de al menos 100.000 bases de longitud y aproximadamente 500.000 bases de longitud y también incluye en la mezcla de sondas ácido nucleico sin marcar para bloqueo, como se expone en la Patente de los EE.UU. No. 5.756.696, los contenidos de la cual se incorporan a la presente como referencia, para evitar la unión no específica de la sonda. También es posible usar ácido nucleico o ácido nucleico peptídico oligomérico sintetizado sin marcar como ácido nucleico de bloqueo. Para alcanzar el locus génico particular, es preferible que las sondas incluyan secuencias de ácido nucleico que abarcan al gen y que por lo tanto hibridizan con ambos lados del locus codificante genómico entero del gen. Las sondas se pueden producir comenzando con clones que contienen ADN humano tales como Cromosomas Artificiales de Bacterias (BAC's) o similares. Las bibliotecas de

BAC para el genoma humano están disponibles en Invitrogen (Carlsbad, CA) y pueden investigarse para la identificación de clones útiles. Es preferible usar el University of California Santa Cruz Genome Browser para identificar secuencias de ADN en el locus objetivo. Estas secuencias de ADN se pueden usar luego para sintetizar cebadores de PCR para cribar bibliotecas de BAC para identificar clones útiles. Los clones se pueden marcar luego con métodos convencionales de traducción por muescas y probarse como sondas para hibridización *in situ*.

Los ejemplos de fluoróforos que se pueden usar en los métodos de hibridización *in situ* que se describen en la presente son: ácido 7-amino-4-metilcoumarin-3-acético (AMCA); Texas Red™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR); 5-(y-6)-carboxi-X-rodamina; lisamina rodamina B; 5-(y-6)-carboxifluoresceína; fluorescein-5-isotiocianato (FITC); ácido 7-dietilaminocoumarin-3-carboxílico, tetrametil-rodamina-5-(y-6)-isotiocianato; 5-(and-6)-carboxitetrametilrodamina; ácido 7-hidroxi-coumarin-3-carboxílico; ácido 6-[fluorescein 5-(y-6)-carboxamido]hexanoico; ácido N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a, 4a diaza-3-indacenepropionico; eosin-5-isotiocianato; eritrosina-5-isotiocianato; 5-(y–6)-carboxirodamina 6G; y Cascade™ azul de acetilazida (Molecular Probes; una marca de Invitrogen).

Las sondas se pueden ver con un microscopio de fluorescencia y un filtro apropiado para cada fluoróforo, o mediante el uso de juegos de filtros de paso dual o triple para observar múltiples fluoróforos. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 5.776.688, los contenidos de la cual se incorporan a la presente como referencia. Se puede usar cualquier método adecuado para adquisición de imágenes microscópicas para visualizar las sondas hibridizadas, incluyendo sistemas automáticos para adquisición de imágenes digitales. Como alternativa, se pueden usar

técnicas tales como citometría de flujo para examinar el patrón de hibridización de las sondas cromosómicas.

A pesar de que se prefiere el análisis de amplificación génica célula por célula que resulta de la hibridización *in situ*, los biomarcadores genómicos también se pueden detectar mediante PCR cuantitativa. En esta forma de realización, se extrae ADN de la muestra de tejido, y luego se amplifica mediante PCR usando un par de cebadores que son específicos para al menos uno de (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un gen que codifica para BH3 humana (tal como un gen BID humano, un gen NOXA humano, un gen PUMA humano, un gen BIK humano, un gen BIM humano y un gen BAD humano), o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano) y en un gen que codifica para BH3 humana (tal como un gen BID humano, un gen NOXA humano, un gen PUMA humano, un gen BIK humano, un gen BIM humano y un gen BAD humano), o mediante PCR multiplex, usando múltiples pares de cebadores. Se puede usar cualquier secuencia de cebadores para los biomarcadores. Los ejemplos de cebadores que se pueden usar se muestran a continuación en la Tabla 4. Luego se determina la presencia de al menos una mutación mediante comparación con un estándar de amplificación de referencia.

Tabla 4

SECUENCIA	**GEN**
sense: 5'-GATGGACGGGTCCGGAGA-3' (SEQ ID NO:1); antisentido: 5'-CTCAGCCCATCTTCTTCCAG-3' (SEQ ID NO:2)	BAX

sense: 5'-TGGTTATGGGATGGGTGAGG (SEQ ID NO:3); antisentido: 5' – CTGCTTTTTCTCGCCCTTCC – 3' (SEQ ID NO:4)	BAK
sense: 5'-TCCGAGGTGCTCCAGTTGGAGGC-3' (SEQ ID NO:5); antisentido: 5'-GCCCGGCCTGGGTCTTTCGC-3' (SEQ ID NO:6)	NOX A

También se puede usar análisis de número de copias basado en microarreglos. En esta forma de realización, se marca el ADN cromosómico después de la extracción para hibridizar a un microarreglo que comprende un sustrato que tiene múltiples sondas de ácido nucleico sin marcar inmovilizadas ordenadas a densidades de sonda de hasta varios millones de sondas por centímetro cuadrado de superficie de sustrato. Existen múltiples formatos de microarreglos y se puede usar cualquiera de estos, en la presente divulgación. Los ejemplos de microarreglos que se pueden usar son Affymetrix GeneChip® Mapping 100K Set SNP Array (Véase Matsuzaki, H., y col., "Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays," *Nat Methods*. 1:109-11 (2004)); the Affymetrix GeneChip® Mapping 250K Assay Kits (tales como el GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array or the GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array) o el Affymetrix GeneChip® Mapping 500K Array Set, cada uno de los cuales está comercialmente disponible en Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA), el Agilent Human Genome aCGH Microarray 44B (disponible en Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA), Illumina microarrays (Illumina, Inc., San Diego, CA), Nimblegen aCGH microarrays (Nimblegen, Inc., Madison, WI), etc. Cuando se usa un microarreglo de oligonucleótidos para detectar amplificaciones, es preferible usar un microarreglo que tenga secuencias de sonda para más de tres localizaciones separadas dentro de la región objetivo. Los ejemplos de sondas que se pueden usar en el microarreglo se muestran a continuación en la Tabla 5

Tabla 5

SEQUENCIA	GEN	SEQ ID NO:
CTTCAATTTTCAAATCAAACTGATC (SNP_A-1936181)	BAX	SEQ ID NO:7
TGAATGCTTTGATTTCCTCACGTTT(SNP_A-2237715)	BAK	SEQ ID NO:8
TTGCCTGAACATCTTGGACATTTTT (SNP_A-1815502)	NOXA	SEQ ID NO:9

E. Detección de expresión: ARNm

El nivel de expresión génica para (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un gen NOXA humano, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano) y un gen NOXA humano se puede determinar mediante la evaluación de la cantidad de uno o más ARNm en la muestra de prueba. Los métodos para medir ARNm en muestras son conocidos en el arte. Para medir niveles de ARNm, se pueden lisar las células en una muestra, y se pueden medir los niveles de ARNm en los lisados o en ARN purificado o semipurificado a partir de los lisados mediante una variedad de métodos que son familiares para las personas con experiencia en el arte. Dichos métodos incluyen a ensayos de hibridización que usan sondas de ADN o ARN detectablemente marcadas (o sea, transferencia Northern) o metodologías de RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa que usan cebadores apropiados de oligonucleótidos. Como alternativa, se pueden llevar a cabo ensayos de hibridización *in situ* cuantitativa o semicuantitativa usando, por ejemplo, secciones de tejido, o suspensiones de células no lisadas, y sondas de ADN

o ARN mercadas en forma detectable (por ejemplo, fluorescentes, o marcadas con enzimas). Otros métodos para cuantificar ARNm incluyen ensayo de protección del ARN (RPA), microarreglos de ADNc y oligonucleótidos, análisis por diferencia de representación (RDA), exposición diferencial, análisis de secuencia de EST, y análisis seriado de expresión génica (SAGE).

En formas de realización apropiadas, se usa la amplificación por PCR para detectar al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un gen NOXA humano, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano) y un gen NOXA humano en la muestra de prueba. Brevemente, en la PCR, se preparan dos secuencias de cenador que son complementarias a las regiones de las hebras complementarias opuestas de la secuencia marcadora, por ejemplo que contiene las secuencias para (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un gen NOXA humano, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano) y un gen NOXA humano. Se agrega un exceso de trifosfatos de desoxinucleótidos a una mezcla de reacción junto con una ADN polimerasa, por ejemplo, Taq polimerasa. Si la secuencia objetivo está presente en una muestra, los cebadores se unirán a la secuencia y la polimerasa producirá que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia marcadora mediante el agregado de nucleótidos. Mediante elevación y disminución de la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos de disociarán del marcador para formar productos de reacción, los cebadores en exceso se unirán al marcador y a los productos de reacción y el proceso se repetirá,

generando de esa forma productos de amplificación. Puede llevarse a cabo un procedimiento de amplificación por PCR con transcriptasa reversa con el objetivo de cuantificar la cantidad de ARNm que se amplificó.

Se puede amplificar y detectar cualquier fragmento adecuado de (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un gen NOXA humano, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano) y un gen NOXA humano. El diseño de cebadores eficaces para PCR está dentro de los conocimientos ordinarios del arte. Típicamente, los fragmentos amplificados para detección son de aproximadamente entre 50 y 300 nucleótidos de longitud.

Los productos de amplificación se pueden detectar de diversas maneras. Los productos de amplificación se puede visualizar mediante electroforesis de la muestra en un gel y tiñendo luego con marcadores de unión a ADN, por ejemplo, bromuro de etidio. Como alternativa, los productos de amplificación se pueden marcar íntegramente con un nucleótido radiactivo o fluorescente y luego visualizarse usando películas de rayos X o bajo el espectro de estimulación apropiado.

La amplificación también se puede monitorear usando métodos "de tiempo real". La PCR a tiempo real permite la detección y cuantificación de un ácido nucleico objetivo. Típicamente, esta estrategia para PCR cuantitativa utiliza una marca fluorescente, que puede ser una marca específica para hebras dobles, tal como el SYBR GREEN®. Como alternativa, se pueden conjugar otras marcas fluorescentes (por ejemplo, FAM o HEX) a una sonda de oligonucleótido o a un cebador. En el arte se conocen diferentes instrumentos capaces de llevar a cabo PCR en tiempo real e incluyen a, por ejemplo, el ABI PRISM® 7900 (Applied Biosystems) y los sistemas

LIGHTCYCLER® (Roche). La señal fluorescente que se genera en cada ciclo de PCR es proporcional a la cantidad de producto de PCR. Se usa un gráfico de la fluorescencia versus número de ciclo para describir la cinética de amplificación y se usa un nivel umbral de fluorescencia para definir un número de ciclo fraccionario que está relacionado con la concentración inicial de molde. Cuando la amplificación se lleva a cabo y se detecta en un instrumento que tiene la capacidad de leer fluorescencia durante el ciclado térmico, se puede diferenciar el producto de PCR de interés de los productos de PCR no específicos usando análisis de fusión. Mediante la medida del cambio de fluorescencia mientras que se incrementa gradualmente la temperatura de la reacción subsiguiente a la amplificación y la generación se señal, es posible determinar el Tm del producto(s) de interés así como también el del producto no específico.

Los métodos pueden incluir amplificar múltiples ácidos nucleicos en la muestra, también conocido como "detección en multiplex" o "*multiplexing*." La PCR multiplex se refiere a la PCR que involucra el agregado de más de un juego de cebadores de PCR a la reacción con el objetivo de detectar y cuantificar múltiples ácidos nucleicos, incluyendo ácidos nucleicos de uno o más marcadores génicos objetivos. Más aun, el *multiplexing* con un control interno (por ejemplo, 18S rRNA, GADPH, o actina) provee un control para la PCR sin reacción.

F. Procesamiento de muestras y desempeño del ensayo

Como se discutió previamente en la presente, la muestra de prueba de la presente divulgación puede ser una muestra de tejido. La muestra de tejido a ensaya mediante los métodos de la presente divulgación puede comprender a cualquier tipo, incluyendo una muestra de sangre periférica, un tejido tumoral o un tejido sospechado

de tumoral, una muestra citológica de capa delgada, una muestra de aspirado con aguja delgada, una muestra de médula ósea, una muestra de nódulo linfático, una muestra de orina, una muestra de ascitos, una muestra de lavado, una muestra de cepillado de esófago, una muestra de lavado de vejiga o pulmón, una muestra de fluido espinal, una muestra de fluido cerebral, una muestra de aspirado ductal, una muestra de descarga de pezón, una muestra de efusión pleural, una muestra de tejido congelado, una muestra de tejido embebido en parafina o una extracto o muestra procesada que se produjo a partir de una muestra de sangre periférica, un tejido tumoral o un tejido sospechado de tumoral, una muestra citológica de capa delgada, una muestra de aspirado con aguja delgada, una muestra de médula ósea, una muestra de nódulo linfático, una muestra de orina, una muestra de ascitos, una muestra de lavado, una muestra de cepillado de esófago, una muestra de lavado de vejiga o pulmón, una muestra de fluido espinal, una muestra de fluido cerebral, una muestra de aspirado ductal, una muestra de descarga de pezón, una muestra de efusión pleural, una muestra de tejido recién congelado o una muestra de tejido embebido en parafina. Por ejemplo, a muestra de sangre periférica de paciente inicialmente se puede procesar para extraer una población de células epiteliales, y luego se puede ensayar este extracto. También se puede usar una microdisección de la muestra de tejido para obtener una muestra de células enriquecida con células sospechadas como tumorales. Las muestras de tejido preferidas para usa en la presente son sangre periférica, tejido tumoral o tejido sospechado de tumoral, incluyendo aspirados de aguja delgada, tejido recién congelado y tejido embebido en parafina, y médula ósea.

La muestra de tejido se puede procesar mediante cualquier método deseado

para llevar a cabo una hibridización *in situ* u otros ensayos con ácidos nucleicos. Para los ensayos de hibridización *in situ* preferidos, se fija una muestra de tejido tumoral o muestra de medula ósea embebido en parafina sobre un porta de vidrio para microscopio y se desparafiniza con un solvente, típicamente xileno. Protocolos útiles para desparafinización de tejido e hibridización *in situ* están disponibles en Abbott Molecular Inc. (Des Plaines, Illinois). Se puede usar cualquier instrumentación o automatización apropiada en la realización de los ensayos de la invención. Se pueden llevar a cabo ensayos basados en PCR en el m2000 Instrument System (Abbott Molecular, Des Plaines, IL). Se puede usar un registro de imágenes automático para los ensayos preferidos de hibridización *in situ* fluorescente.

En una forma de realización, la muestra comprende una muestra de sangre periférica de un paciente que se procesa para producir un extracto de células tumorales o cancerígenas circulantes a examinar para la presencia o ausencia de al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un gen NOXA humano, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano) y un gen NOXA humano. Las células tumorales circulantes se pueden separar mediante tecnología de separación inmunomagnética tal como la que está disponible en Immunicon (Huntingdon Valley, Pennsylvania). La al menos una mutación que se determina para las células tumorales circulantes se compara entonces con el nivel basal o nivel predeterminado de células tumorales circulantes a las que se ha hecho la determinación de la presencia o ausencia de una o más mutaciones determinadas en un punto de tiempo anterior, tal como al comienzo de la terapia. Los incrementos de la presencia de al menos una mutación en comparación

con el nivel basal o el nivel predeterminado pueden indicar una falla de la terapia.

Las muestras prueba pueden comprender cualquier número de células que sean suficiente para un diagnóstico clínico, y típicamente contienen al menos aproximadamente 100 células. En un ensayo típico de FISH, se evalúa el patrón de hibridización en entre aproximadamente 25 y 1.000 células. Las muestras prueba típicamente se consideran como "positivas a la prueba" cuando se halla que contienen amplificación génica en una proporción suficiente de la muestra. El número de células identificadas con al menos una mutación y que se usan para clasificar a una muestra en particular como positiva, en general, varía con el número de células en la muestra. El número de células que se usa para una clasificación positiva también se conoce como valor de corte. Los ejemplos de valores de corte que se pueden usar en las determinaciones incluyen a 5, 25, 50, 100 y 250 células, o 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50% y 60% de las células de la población de la muestra. Tan poco como una célula puede ser suficiente para clasificar a una muestra como positiva. En una muestra típica de tejido embebido en parafina, se prefiere identificar al menos 30 células como positivas y se prefiere más identificar al menos 20 células como positivas por tener al menos una mutación. Por ejemplo, la detección en un carcinoma colorrectal típico embebido en parafina de 30 células sería suficiente para clasificar el tejido como positivo y elegible para tratamiento.

G. Conjuntos de componentes

La presente exposición también contempla una variedad de conjuntos de componentes. En un aspecto, el conjunto de componentes contiene al menos los siguientes dos agentes terapéuticos: (1) al menos un agente inductor de poliploidía; y (2) al menos un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2. Además, el conjunto de

componentes opcionalmente puede incluir instrucciones para usar, o sea, la administración de los al menos dos agentes terapéuticos a un paciente que sufre de cáncer y que necesita de dicho tratamiento. Estas instrucciones se pueden proveer en forma de papel o en forma leíble por computadora, tal como un disco, CD, DVD o similar.

En otro aspecto, el conjunto de componentes de la presente divulgación es a conjunto de componentes para detectar la presencia o ausencia de al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un gen NOXA humano, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano) y un gen NOXA humano en una muestra de prueba. Los ejemplos de genes para los que se detecta la presencia o ausencia de al menos una mutación usando dicho conjunto de componentes es un gen BAX humano, un gen BAK humano, un gen NOXA humano y cualquier combinación de los mismos. Dichos conjuntos de componentes pueden comprender uno o más reactivos para determinar la presencia o ausencia de la al menos una mutación previamente descrita. Por ejemplo, dicho conjunto de componentes puede contener una o más sondas de ácido nucleico. Como alternativa, o además de las sondas, el conjunto de componentes puede contener uno o más cebadores de ácido nucleico.

Por consiguiente, la presente divulgación provee además conjuntos de componentes para diagnóstico y control de calidad, que comprenden uno o más cebadores de ácidos nucleicos, sondas de ácido nucleico o cebadores de ácidos nucleicos y sondas descritas en la presente. Opcionalmente, los ensayos, los conjuntos de componentes y los componentes del conjunto de componentes de la

presente divulgación se pueden optimizar para usar en plataformas comerciales (por ejemplo, inmunoensayos en las plataformas PRISM®, AxSYM®, ARCHITECT® y EIA (Bead) de Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, así como también en otros ensayos diagnósticos comerciales y/o *in vitro*). Además, los ensayos, conjuntos de elementos y los componentes del conjunto de elementos pueden emplearse en otros formatos, por ejemplo, en otros sistemas de ensayo electroquímicos manuales o cerca del paciente. La presente exposición es, por ejemplo, aplicable al sistema comercial de inmunoensayo electroquímico Abbott Point of Care (i-STAT®, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) que lleva a cabo inmunoensayos en sándwich para diversos marcadores cardiacos, incluyendo TnI, CKMB y BNP. Los inmunosensores y los métodos para operarlos en dispositivos de prueba de un solo uso se describen, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nos. 2003/0170881, 2004/0018577, 2005/0054078 y 2006/0160164, las que se incorporan a la presente como referencia. Otros antecedentes sobre la fabricación de inmunosensores electroquímicos y de otros tipos se encuentran en la Patente de los EE.UU. No. 5.063.081 la que también se incorpora como referencia por sus contenidos con respecto a lo mismo.

Opcionalmente, los conjuntos de componentes incluyen reactivos para control de calidad (por ejemplo, paneles de sensibilidad, calibradores, y controles positivos). La preparación de reactivos para control de calidad es bien conocida en el arte, y se describe, por ejemplo, en una variedad de hojas informativas de productos inmunodiagnósticos.

El conjunto de componentes puede incorporar una detectable, tal como un fluoróforo, grupo radioactivo, enzima, marca de biotina/avidina, cromóforo, marca

quimioluminiscente, o similar, o el conjunto de componentes puede incluir reactivos para marcar los cebadores de ácidos nucleicos, las sondas de ácido nucleico o los cebadores de ácido nucleico y las sondas de ácido nucleico para detectar la presencia o ausencia de al menos una mutación como se describe en la presente. Los cebadores y/o sondas, calibradores y/o controles pueden proveerse en recipientes separados o pre-dispensados en un formato de ensayo apropiado, por ejemplo, en placas de microtitulación.

El conjunto de elementos o conjunto de componentes opcionalmente puede incluir otros reactivos que se requieren para llevar a cabo un ensayo diagnostico o para facilitar las evaluaciones de control de calidad, tales como amortiguadores, sales, enzimas, cofactores de enzimas, sustratos, reactivos de detección, y similares. Otros componentes, tales como amortiguadores y soluciones para el aislamiento y/o tratamiento de una muestra de prueba (por ejemplo, reactivos de pretratamiento), también pueden incluirse en el conjunto de elementos. El conjunto de elementos además puede incluir uno o más de otros controles. Uno o más de los componentes del conjunto de elementos puede esta liofilizado, en cuyo caso el conjunto de elementos además puede comprender reactivo apropiados para la reconstitución de los componentes liofilizados.

Los diferentes componentes del conjunto de componentes opcionalmente se proveen en recipientes apropiados. Como se indicó previamente, uno o más de los recipientes puede ser una placa de microtitulación. El conjunto de elementos además puede incluir recipientes para sostener o almacenar una muestra (por ejemplo, un recipiente o cartucho para una muestra de sangre u orina). En los casos apropiados, el conjunto de elementos opcionalmente también pueden contener recipientes de

reacción, recipientes de mezclado, y otros componentes que facilite la preparación de reactivos o de la muestra de prueba. El conjunto de elementos también puede incluir uno o más instrumentos para asistir en la obtención de una muestra de prueba, tal como una jeringa, pipeta, pinzas, cuchara de medida, o similares.

El conjunto de componentes además puede incluir opcionalmente instrucciones de uso, que se pueden proveer en forma de papel o en forma accesible por computadora, tal como un disco, CD, DVD o similar.

H. Adaptación de los conjuntos de componentes

El conjunto de componentes (o componentes del mismo), así como también el método para determinar la presencia o ausencia de al menos una mutación en (i) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano), (ii) un gen NOXA humano, o (iii) un gen que codifica para Bcl-2 proapoptótica humana (tal como un gen BAX humano y un gen BAK humano) y un gen NOXA humano usando los componentes y métodos que se describen en la presente, se puede adaptar para usar en una variedad de sistemas automatizados o semiautomatizados (incluyendo aquellos en donde la fase sólida comprende una microplata), como se describe, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5089424 y 5006309, y como se encuentra comercialmente en el mercado, por ejemplo, en Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) como ARCHITECT®.

Algunas de las diferencias entre un sistema automatizado o semiautomatizado en comparación con un sistema no automatizado (por ejemplo, ELISA) incluyen al sustrato al cual se une el primer compañero de unión específico (por ejemplo, anticuerpo de captura) (que puede tener un efecto sobre la formación del sándwich y la reactividad del analito), y la longitud y tiempo de la captura, detección y/o cualquier

paso opcional de lavado. Mientras que un formato no automatizado, tal como un ELISA, puede requerir un tiempo de incubación relativamente más largo con la muestra y con el reactivo de captura (por ejemplo, alrededor de 2 horas), un formato automatizado o semiautomatizado (por ejemplo, ARCHITECT®, Abbott Laboratories) puede tener un tiempo de incubación relativamente más corto (por ejemplo, de aproximadamente 18 minutos para ARCHITECT®). En forma similar, mientras que un formato no automatizado, tal como un ELISA, puede incubar a un anticuerpo de detección, tal como el reactivo conjugado, durante un tiempo de incubación relativamente más largo (por ejemplo, alrededor de 2 horas), un formato automatizado o semiautomatizado (por ejemplo, ARCHITECT®) puede tener un tiempo de incubación relativamente más corto (por ejemplo, de aproximadamente 4 minutos para el ARCHITECT®).

Otras plataformas disponibles de Abbott Laboratories incluyen, pero no como limitación, AxSYM®, IMx® (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 5.294.404, que se incorpora a la presente documentación como referencia en su totalidad), PRISM®, EIA (esfera), y Quantum™ II, así como también otras plataformas. Además, los ensayos, conjuntos de elementos y los componentes del conjunto de elementos pueden emplearse en otros formatos, por ejemplo, en otros sistemas de ensayo electroquímicos manuales o cerca del paciente. La presente exposición es, por ejemplo, aplicable al sistema de inmunoensayo electroquímico Abbott Point de Care (i-STAT®, Abbott Laboratories) que lleva a cabo inmunoensayos en sándwich. Los inmunosensores y sus métodos de fabricación y operación en dispositivos de prueba de un solo uso se describen, por ejemplo en la Patente de los EE.UU. No. 5.063.081, las Publicaciones de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nos

2003/0170881, 2004/0018577, 2005/0054078, y 2006/0160164, que se incorporan en sus totalidades como referencia por sus contenidos con respecto a lo mismo.

Es evidente que los métodos y conjuntos de elementos como se los describe la presente abarcan necesariamente otros reactivos y métodos para llevar a cabo el ensayo. Por ejemplo, se abarcan diferentes soluciones amortiguadoras tales como las que se conocen en el arte y/o que se pueden preparar u optimizar fácilmente para su empleo.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para proveer lo que se considera la descripción más útil y fácilmente comprensible de los procedimientos y aspectos conceptuales de esta divulgación.

EJEMPLO 1A

Se agitó 3-(R)-((Carbobenciloxi)amino)-γ-butirolactona, preparada como se describe en J. Am. Chem. Soc. 1986, 108, 4943-4952, (62 g) y morfolina (46 ml) en dioxano (700 ml) a 65°C durante 24 horas, se enfrió y se concentró. El concentrado se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con metanol/acetato de etilo 10%.

EJEMPLO 1B

El EJEMPLO 1A (16,5 g), disulfuro de difenilo (14,5 g) y tributilfosfina (16,6 ml) en tolueno (250 ml) a 80°C se agitaron durante 24 horas, se enfrió y se concentró. El concentrado se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexanos 1:1.

EJEMPLO 1C

El EJEMPLO 1B (18 g) en HBr en ácido acético 30% (250 ml) a 25°C se agitó durante 24 horas, se concentró, se volcó sobre HCl 1M y se extrajo con éter dietílico. El extracto se extrajo con HCl 1M, y este extracto se enfrió a 0°C, se ajustó a pH 12

con KOH y se extrajo con diclorometano. El extracto se lavó con salmuera y se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró.

EJEMPLO 1D

El EJEMPLO 1C (45,4 g) en THF (500 ml) a 55°C se trató con BH_3·THF 1M (650 ml) a lo largo de 2 horas, se agitó durante 24 horas, se enfrió a 0°C, se trató con metanol (80 ml), se volcó sobre metanol (500 ml) y se concentró. Una mezcla de el concentrado en metanol (400 ml) se trató con a metanol saturado con HCl (800 ml), se sometió a reflujo durante 24 horas, se enfrió, se concentró, se volcó sobre NaOH 2M y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se lavó con NaOH 1M y salmuera y se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El concentrado se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con acetato de etilo metanol/acetato de etilo 10% y metanol 10%/acetonitrilo 10%/TEA 5%/acetato de etilo 75%.

EJEMPLO 1E

Se saturó clorhidrato de metilviologeno (1,17 g) en DMF (80 ml) a 25ºC con ioduro de trifluorometilo, se trató con 2-fluorobencenotiol (9,7 ml) y TEA (20 ml), se agitó durante 24 horas, se diluyó con agua (240 ml) y se extrajo con éter dietílico. El extracto se lavó con NaOH 1M, cloruro de amonio saturado y salmuera y se concentró.

EJEMPLO 1F

El EJEMPLO 1E (17,346 g) en tetracloruro de carbono/acetonitrilo/agua 1:1:2 (800 ml) a 25ºC se trató con periodato de sodio (56,8 g) y cloruro de rutenio(III) hidratado (183 mg), se agitó durante 18 horas, se diluyó con diclorometano (100 ml) y se filtró a través de tierras diatomeas (Celite®). El material filtrado se lavó con bicarbonato de sodio saturado y se extrajo con diclorometano. El extracto se lavó con

salmuera y se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró. El concentrado se filtró a través de gel de sílice.

EJEMPLO 1G

El EJEMPLO 1F (37,3 g) en ácido clorosulfónico (32,8 ml) a 120°C se agitó durante 18 horas, se enfrió a 25°C y se depositó con una pipeta sobre hielo picado. La mezcla se extrajo con acetato de etilo, y el extracto se lavó con agua y salmuera y se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró.

EJEMPLO 1H

El EJEMPLO 1G (23 g) en isopropanol (706 ml) a -78°C se trató con hidróxido de amonio (98 ml) durante 1 hora, se agitó durante 1 hora, se detuvo con HCl 6M (353 ml), se calentó a 25°C y se concentró. El concentrado se mezcló con agua y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró. El concentrado se recristalizó a partir de acetato de etilo/hexano.

EJEMPLO 1I

El EJEMPLO 1H (13,48 g) y el EJEMPLO 1D (11,56 g) en THF (218 ml) se trataron con DIEA (15,1 ml), se agitó a 50°C durante 4 horas, se enfrió, se trató con bicarbonato de sodio saturado y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró. El concentrado se recristalizó a partir de hexanos/acetato de etilo.

EJEMPLO 1J

Se trató DMF (10 ml) y cloroformo (80 ml) a 3°C con PBr_3 (12 ml), se agitó durante 20 minutos a 25°C, se trató con 4,4-dimetilciclohexanona (7,15 g) en cloroformo (50 ml), se agitó durante 18 horas, se volcó sobre hielo, se neutralizó con bicarbonato de sodio sólido y se extrajo con éter dietílico. El extracto se lavó con

salmuera y se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró. El concentrado se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexanos 0-10%.

EJEMPLO 1K

Se trató el EJEMPLO 1J (1,7 g) y etiléster de ácido 4-piperazin-1-ilbenzoico (1,9 g) en metanol (30 ml) con cianoborohidruro de sodio (0,6 g), se ajustó a pH 5 con ácido acético, se agitó durante 18 horas y se filtró a través de tierras diatomeas (Celite®). El material filtrado se concentró, y el concentrado se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexanos 10-30%.

EJEMPLO 1L

Se agitó el EJEMPLO 1K (1,1 g), ácido 4-clorofenilborónico (0,6 g), Na_2CO_3 2M (2 ml) y $PdCl_2(PPh_3)_2$ (0,1 g) en DME/agua/etanol 7:3:2 (20 ml) a 85ºC durante 18 horas, se filtró a través de tierras diatomeas (Celite®) y se concentró. El concentrado se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexanos 10-30%.

EJEMPLO 1M

Se agitó el EJEMPLO 1L (4,59 g) y LiOH (1,25 g) en dioxano (75 ml) y agua (10 ml) a 100ºC durante 18 horas, se enfrió a 25ºC y se concentró. El concentrado se disolvió en agua, se calentó a reflujo, se neutralizó con HCl 1M (28,5 ml), se enfrió a 25ºC, se filtró y se concentró.

EJEMPLO 1N

Se agitó el EJEMPLO 1M (31,5 g), EJEMPLO 1I (39,93 g), EDAC·HCl (20,60 g) y DMAP (13,15 g) en diclorometano (500 ml) a 25ºC durante 18 horas, se diluyó con diclorometano, se lavó con cloruro de amonio saturado y salmuera y se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró. El concentrado se sometió a cromatografía sobre gel de sílice

con metanol/diclorometano saturado con amoníaco 0-10% . ^{1}H RMN (300MHz, DMSO-d_6) □ 8,12 (d, 1H), 7,94 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,38 (d, 2H), 7,30 (m, 4H), 7,18 (m, 1H), 7,12 (d, 2H), 6,98 (d, 1H), 6,85 (d, 3H), 4,07 (m, 1H), 3,53 (ancho, 4H), 3,28 (m, 12H), 2,44 (m, 8H), 1,99 (m, 3H), 1,80 (m, 1H), 1,44 (t, 2H), 0,97 (s, 6H).

EJEMPLO 2A

Se saturó NaOH en polvo (31,2 g), TDA-1 (5 ml) y 2-fluorobencenotiol (33,6 ml) en benceno (400 ml) con clorodifluorometano, se agitó a 80°C durante 30 minutos y se filtró a través de tierras diatomeas (Celite®). El material filtrado se lavó con $NaHCO_3$ saturado y la fase acuosa se extrajo con éter dietílico. Los extractos se combinaron y se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró.

EJEMPLO 2B

El EJEMPLO 2A (46 g) en CCl_4/CH_3CN/agua 1:1:2 (1,2L) a 25°C se trató con $NaIO_4$ (165,6 g) y $RuCl_3 \cdot xH_2O$ (534 mg), se agitó durante 18 horas, se diluyó con diclorometano y se filtró a través de tierras diatomeas (Celite®). El material filtrado se lavó con $NaHCO_3$ saturado y se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El concentrado se filtró a través de gel de sílice.

EJEMPLO 2C

El EJEMPLO 2B (25 g) y NCS (17,55 g) en THF (700 ml) a -78 °C se trató con LHMDS (178,5 ml) durante 1 hora, se agitó durante 1 hora y se detuvo con cloruro de amonio. La mezcla se extrajo con acetato de etilo, y el extracto se lavó con salmuera y se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró. El concentrado se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexanos 0-5%.

EJEMPLO 2D

El EJEMPLO 2C (44 g) en ácido clorosulfónico (36,7 ml) a 120°C se agitó

durante 18 horas, se enfrió a 25ºC, se depositó con una pipeta sobre hielo picado y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se lavó con agua y salmuera y se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró.

EJEMPLO 2E

El EJEMPLO 2D (22 g) en isopropanol (700 ml) a -78 °C se trató con amoníaco acuoso (90 ml) durante 1 hora, se agitó durante otra hora, se detuvo con HCl 6M (300 ml), se calentó a 25ºC y se concentró. El concentrado se mezcló con agua y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró. El concentrado se recristalizó a partir de hexanos/acetato de etilo.

EJEMPLO 2F

El EJEMPLO 2E (2,89 g) y el EJEMPLO 1D (2,39 g) en THF (20 ml) se trataron con diisopropiletilamina (3,2 ml), se agitó a 60ºC durante 18 horas, se enfrió, se trató con bicarbonato de sodio saturado y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró. El concentrado se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con amoníaco en metanol 7M/diclorometano 1,5-5%.

EJEMPLO 2G

Se trató NaH en aceite 60% lavado con hexano (17 g) en diclorometano (300 ml) a -5ºC con metiléster de ácido 4,4-dimetil-2-oxo-ciclohexanocarboxílico, preparado como se describe en Tetrahedron (1992), 48 (21), 4459-64, (53,89 g), se agitó durante 30 minutos, se enfrió a -78°C, se trató con anhídrido trifluorometansulfónico, se calentó a 25ºC, se agitó durante 18 horas, se lavó con salmuera y se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró.

EJEMPLO 2H

Se agitó el EJEMPLO 2G (86 g), ácido 4-clorofenilborónico (50 g), CsF (104 g)

y tetrakis(trifenilfosfin)paladio(0) (2,5 g) en 2:1 DME/metanol (600 ml) a 70°C durante 18 horas y se concentró. El concentrado se disolvió en éter dietílico, y la solución se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró. El concentrado se filtró a través de gel de sílice con acetato de etilo/hexanos 20%.

EJEMPLO 2I

Se trató borohidruro de litio (18 g) con el EJEMPLO 2H (76 g) en éter dietílico (400 ml) y metanol (23 ml), se agitó a reflujo durante 4 horas, se enfrió, se detuvo con HCl 1M, se diluyó con agua y se extrajo con éter dietílico. El extracto se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró. El concentrado se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexanos 0-30%.

EJEMPLO 2J

El EJEMPLO 2I (17,5 g) en diclorometano (100 ml) a 0ºC se trató simultáneamente con cloruro de metansulfonilo (5,6 ml) y TEA (21 ml), se agitó durante 5 minutos, se trató con etiléster de ácido 4-piperazin-1-ilbenzoico (17 g), se agitó a 25ºC durante 18 horas, se lavó con cloruro de amonio y se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El concentrado se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexanos 10%.

EJEMPLO 2K

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 2J en lugar del EJEMPLO 1L en el EJEMPLO 1M.

EJEMPLO 2L

El EJEMPLO 2K (16,9 g) y el EJEMPLO 2F (22 g) en diclorometano (200 ml) a 25ºC se trataron con EDAC·HCl (11,06 g) y DMAP (7,06 g), se agitó durante 18 horas, se diluyó con diclorometano (400 ml), se lavó con cloruro de amonio saturado y

salmuera y se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró. El concentrado se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con metanol/diclorometano saturado con amoníaco 0-10%. ^{1}H RMN (400MHz, DMSO-d_6) □ 8,07 (d, 1H), 7,90 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,36 (m, 4H), 7,29 (m, 2H), 7,20 (m, 1H), 7,09 (d, 2H), 6,86 (d, 1H), 6,80 (d, 2H), 6,76 (d, 1H), 4,02 (m, 1H), 3,50 (m, 4H), 3,33 (m, 2H), 3,16 (m, 4H), 2,81 (s, 2H), 2,29 (m, 12H), 1,99 (s, 2H), 1,94 (m, 1H), 1,71 (m, 1H), 1,42 (t, 2H), 0,96 (s, 6H).

EJEMPLO 3A

Este ejemplo se preparó utilizando 2-bromo-ciclohex-1-enecarbaldehído, preparado como se describe en Collect. Czech. Chem. Commun., 1961, 26, 3059.) en lugar del EJEMPLO 1J en el EJEMPLO 1K.

EJEMPLO 3B

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 3A en lugar del EJEMPLO 1K en el EJEMPLO 1L.

EJEMPLO 3C

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 3B en lugar del EJEMPLO 1L en el EJEMPLO 1M.

EJEMPLO 3D

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 3C y el EJEMPLO 2F en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400MHz, DMSO-d_6) □ 8,11 (d, 1H), 7,92 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,37 (d, 2H), 7,34 (m, 2H), 7,27 (t, 2H), 7,18 (t, 1H), 7,12 (d, 2H), 6,94 (d, 1H), 6,84 (m, 3H), 4,04 (m, 1H), 3,51 (ancho, 4H), 3,27 (ancho, 10H), 2,84 (ancho, 2H), 2,33 (ancho, 6H), 2,18 (ancho, 4H), 1,97 (m, 1H), 1,76 (m, 1H), 1,66 (s, 4H).

EJEMPLO 4A

Una solución de 3-(R)-((carbobenciloxi)amino)-γ-butirolactona (preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en J. Am. Chem. Soc. 1986, 108, 4943-4952, 7,72 g, 32,8 mmol) en THF (100mL) se saturó con dimetilamina gaseosa, se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, y se concentró. El residuo se filtró a través de un tapón de gel de sílice eluyendo con acetona en hexanos 50% para dar el producto deseado.

EJEMPLO 4B

Una solución de EJEMPLO 4A (8,45 g, 30,14 mmol) en tolueno (15 ml) se trató con tributilfosfina (9,76 ml, 39,20 mmol) y difenildisulfuro (7,30 g, 39,20 mmol) y se calentó a 80 °C durante 16 horas. La mezcla de la reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos 0–50% para dar el producto deseado.

EJEMPLO 4C

Se agitó el EJEMPLO 4B (7,5g) y hidruro de cloruro de bis(ciclopentadienil)zirconio(IV) (10,31 g) en THF (100 ml) a 25°C durante 20 minutos y se concentró. El concentrado se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con acetato de etilo en hexano 50%.

EJEMPLO 4D

Se trató el EJEMPLO 4C (2,87 g) y N-isopropilmetilamina (1,92 g) en 1,2-dicloroetano (50 ml) a 25°C con triacetoxiborohidruro de sodio (3 g), se agitó durante 2 horas, se diluyó con acetato de etilo, se lavó con NaOH 2M, agua y salmuera y se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El concentrado se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con metanol/diclorometano 1%.

EJEMPLO 4E

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 4D en lugar del EJEMPLO 1B en el EJEMPLO 1C.

EJEMPLO 4F

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 4E en lugar del EJEMPLO 1D en el EJEMPLO 1I.

EJEMPLO 4G

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 4F en lugar del EJEMPLO 1I en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) □ 8,08 (s, 1H), 7,98 (d, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,37 (m, 4H), 7,28 (t, 2H), 7,20 (t, 1H), 7,12 (d, 2H), 6,89 (d, 1H), 6,78 (d, 2H), 6,70 (d, 1H), 4,01 (m, 1H), 3,13 (m, 6H), 2,75 (m, 2H), 2,28 (m, 6H), 2,04 (m, 4H), 1,99 (m, 2H), 1,43 (m, 2H), 1,12 (m, 10H), 0,97 (s, 6H).

EJEMPLO 5

Este ejemplo se preparó utilizando ácido 4-(4-(2-(4-clorofenil)ciclo-1-enilmetil)piperazin-1-il)benzoico, preparado como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de titularidad común Nº 10/988338, y el EJEMPLO 4F en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) □ 9,00 (m, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,98 (d, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,36 (m, 4H), 7,30 (t, 2H), 7,20 (t, 1H), 7,09 (d, 2H), 6,90 (d, 1H), 6,78 (d, 2H), 6,65 (d, 1H), 4,00 (m, 2H), 3,13 (m, 4H), 2,78 (m, 2H), 2,55 (m, 2H), 2,40 (m, 4H), 2,31 (m, 4H), 2,00 (m, 3H), 1,79 (m, 4H), 1,58 (m, 4H), 1,51 (m, 2H), 1,12 (m, 6H).

EJEMPLO 6A

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 4B en lugar del EJEMPLO 1B en el EJEMPLO 1C.

EJEMPLO 6B

El EJEMPLO 6A (6,13 g) en THF (200 ml) a 25ºC se trató con dicarbonato de di-tert-butilo (7 g), se agitó durante 4 horas y se concentró. El concentrado se disolvió en acetato de etilo (500 ml), se lavó con NaOH 1M, agua y salmuera y se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El concentrado en THF (200 ml) a 25ºC se trató con NaOH 1M (200 ml), se agitó durante 5 horas y se aisló. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo, y los extractos en THF y acetato de etilo se combinaron, se lavó con agua y salmuera y se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró.

EJEMPLO 6C

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 6B en lugar del EJEMPLO 5B en el EJEMPLO 4C.

EJEMPLO 6D

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 6C y 2-oxa-5-aza-biciclo[2,2,1]heptano, preparado como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de titularidad común Nº 10/988,338, en lugar del EJEMPLO 4C y N-isopropilmetilamina en el EJEMPLO 4D.

EJEMPLO 6E

El EJEMPLO 6D (7,86 g) en diclorometano (200 ml) a 25ºC se trató con HCl 2M en éter dietílico (200 ml), se agitó durante 18 horas y se concentró.

EJEMPLO 6F

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 6E en lugar del EJEMPLO 1D en el EJEMPLO 2F.

EJEMPLO 6G

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 6F y el EJEMPLO ºC en lugar del EJEMPLO 1I y el EJEMPLO 1M en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-

d_6) □ 8,07 (s, 1H), 7,92 (d, 1H), 7,70 (d, 2H), 7,37 (m, 4H), 7,30 (t, 2H), 7,21 (t, 1H), 7,12 (d, 2H), 6,84 (d, 1H), 6,79 (d, 2H), 4,21 (m, 1H), 4,09 (m, 1H), 4,01 (m, 2H), 3,82 (m, 2H), 3,46 (m, 1H), 3,18 (m, 6H), 2,86 (m, 4H), 2,75 (m, 4H), 2,28 (m, 2H), 2,18 (m, 4H), 1,88 (m, 4H), 1,66 (m, 4H).

EJEMPLO 7

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO ºC en lugar del EJEMPLO 1M en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (300MHz, DMSO-d_6) □ 8,09 (d, 1H), 7,92 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,31 (m 7H), 7,18 (tt, 1H), 7,12 (dt, 2H), 6,92 (d, 1H), 6,82 (m, 3H), 4,04 (m, 1H), 3,51 (m, 4H), 3,26 (m, 10H), 2,82 (m, 2H), 2,30 (m, 10H), 1,94 (m, 1H), 1,72 (m, 5H).

EJEMPLO 8A

Una solución de ácido 3-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-4-fenilsulfanilbutírico, preparado como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de titularidad común Nº 10/988,338, y HATU en DMF se trató con 7-aza-biciclo[2,2,1]heptano (preparado como se describe en Org. Lett., 2001, 3, 1371-1374); y N-metilmorfolina, se agitó a temperatura ambiente durante 30min, se diluyó con acetato de etilo, se lavó con HCl 1,5%, $NaHCO_3$(aq), H_2O y salmuera, se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró para dar el producto deseado.

EJEMPLO 8B

Una solución de EJEMPLO 8A en THF se trató con dietilamina, se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con CH_2Cl_2 (saturado con NH_3), seguido por acetato de etilo para dar el producto deseado.

EJEMPLO 8C

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 8B en lugar del EJEMPLO 1C en el EJEMPLO 1D.

EJEMPLO 8D

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO ºC en lugar del EJEMPLO 1D en el EJEMPLO 1I.

EJEMPLO 8E

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 8D y el EJEMPLO ºC en lugar del EJEMPLO 1I y el EJEMPLO 1M, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (300MHz, DMSO-d_6) □ 9,19 (m, 1H), 8,07 (d, 1H), 7,97 (d, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,31 (m 6H), 7,20 (tt, 1H), 7,12 (dt, 2H), 6,89 (d, 1H), 6,76 (d, 2H), 6,65 (d, 1H), 4,03 (m, 2H), 3,31 (m, 4H), 3,12 (m, 4H), 2,90 (ancho, 2H), 2,76 (m 2H), 1,96 (m, 21H).

EJEMPLO 9A

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 6E en lugar del EJEMPLO 1D en el EJEMPLO 1I.

EJEMPLO 9B

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 9A y el EJEMPLO ºC en lugar del EJEMPLO 1I y el EJEMPLO 1M, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (300MHz, DMSO-d_6) □ 8,08 (d, 1H), 7,94 (d, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,32 (m 7H), 7,20 (tt, 1H), 7,12 (dt, 2H), 6,87 (d, 1H), 6,78 (d, 3H), 4,40 (m, 1H), 4,03 (m, 2H), 3,83 (m, 2H), 3,54 (m, 2H), 3,26 (m, 2H), 3,14 (m, 4H), 2,80 (ancho, 2H), 2,78 (m, 4H), 1,97 (m, 14H).

EJEMPLO 10

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 9A en lugar del EJEMPLO 1I en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (300MHz, DMSO-d_6) □ 8,09 (d, 1H), 7,95 (d, 1H), 7,71

(d, 2H), 7,33 (m 7H), 7,20 (tt, 1H), 7,12 (dt, 2H), 6,90 (d, 1H), 6,79 (d, 3H), 4,44 (m, 1H), 4,03 (m, 1H), 3,84 (m, 1H), 3,57 (m, 1H), 3,02 (m, 13H), 2,25 (m, 6H), 1,99 (m, 6H), 1,43 (t, 2H), 0,97 (s, 6H).

EJEMPLO 11

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 6F en lugar del EJEMPLO 1I en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (300MHz, DMSO-d_6) □ 8,07 (d, 1H), 7,93 (d, 1H), 7,70 (d, 2H), 7,33 (m 7H), 7,20 (tt, 1H), 7,12 (dt, 2H), 6,81 (m, 4H), 4,41 (m, 1H), 4,06 (m, 1H), 3,83 (m, 1H), 3,47 (m, 1H), 3,02 (m, 13H), 2,25 (m, 6H), 1,99 (m, 6H), 1,43 (t, 2H), 0,97 (s, 6H).

EJEMPLO 12

Este ejemplo se preparó utilizando ácido 4-(4-(2-(4-clorofenil)ciclohept-1-enilmetil)piperazin-1-il)benzoico, preparado como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de titularidad común Nº 10/988,338, y el EJEMPLO 9A en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (300MHz, DMSO-d_6) □ 8,09 (d, 1H), 7,95 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,32 (m 7H), 7,19 (tt, 1H), 7,09 (dt, 2H), 6,90 (d, 1H), 6,79 (d, 3H), 4,45 (m, 1H), 4,03 (m, 2H), 3,85 (m, 2H), 3,55 (m, 2H), 3,04 (m, 8H), 2,34 (m, 8H), 1,85 (m, 7H), 1,54 (m, 5H).

EJEMPLO 13

Este ejemplo se preparó utilizando ácido 4-(4-(2-(4-clorofenil)ciclohept-1-enilmetil)piperazin-1-il)benzoico, preparado como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de titularidad común Nº 10/988,338, y el EJEMPLO 6F en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (300MHz, DMSO-d_6) □ 8,07 (d, 1H), 7,93 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,32 (m 7H), 7,20 (tt, 1H), 7,09 (dt, 2H), 6,87 (d, 1H), 6,79 (d, 3H), 4,45 (m, 1H), 4,02 (m, 2H), 3,84

(m, 2H), 3,56 (m, 2H), 3,07 (m, 8H), 2,33 (m, 8H), 1,85 (m, 7H), 1,54 (m, 5H).

EJEMPLO 14

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 2K y el EJEMPLO 4F en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (300MHz, DMSO-d_6) □ 8,07 (d, 1H), 7,96 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,33 (m 7H), 7,20 (tt, 1H), 7,09 (dt, 2H), 6,87 (d, 1H), 6,77 (d, 2H), 6,72 (d, 1H), 4,00 (m, 1H), 3,28 (m, 4H), 3,12 (m, 4H), 2,79 (m, 2H), 2,48 (m, 2H), 2,23 (m, 8H), 2,02 (m, 4H), 1,42 (t, 2H), 1,08 (m, 6H), 0,96 (s, 6H).

EJEMPLO 15A

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 6C y 1,4-oxazepan en lugar del EJEMPLO 4C y N-isopropil-N-metilamina en el EJEMPLO 4D.

EJEMPLO 15B

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 15A en lugar del EJEMPLO 6D en el EJEMPLO 6E.

EJEMPLO 15C

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 15B en lugar del EJEMPLO 1D en el EJEMPLO 1I.

EJEMPLO 15D

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 15C y el EJEMPLO °C en lugar del EJEMPLO 1I y el EJEMPLO 1M, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400MHz, $CDCl_3$) □ 8,32 (s, 1H), 8,01 (ancho, 1H), 7,67 (d, 2H), 7,34 (t, 4H), 7,24 (m, 3H), 6,99 (m, 3H), 6,67 (ancho, 3H), 3,97 (ancho, 1H), 3,88 (s, 2H), 3,79 (s, 2H), 3,73-3,23 (br m, 12H), 3,14 (m, 6H), 2,29 (s, 6H), 2,08 (m, 2H), 1,74 (s, 4H).

EJEMPLO 16A

Este ejemplo se preparó utilizando azepan en lugar de N-isopropil-N-metilamina en el EJEMPLO 4D.

EJEMPLO 16B

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 16A en lugar del EJEMPLO 4D en el EJEMPLO 4E.

EJEMPLO 16C

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 16A en lugar del EJEMPLO 1D en el EJEMPLO 1I.

EJEMPLO 16D

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 16C y el EJEMPLO ºC en lugar del EJEMPLO 1I y el EJEMPLO 1M, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400MHz, $CDCl_3$) □ 8,33 (s, 1H), 8,01 (d, 1H), 7,67 (d, 2H), 7,34 (t, 4H), 7,23 (m, 3H), 6,98 (m, 3H), 6,67 (m, 3H), 3,99 (m, 1H), 3,82-3,19 (br m, 10H), 3,12 (s, 4H), 2,86 (m, 2H), 2,55 (ancho, 2H), 2,29 (s, 4H), 2,06 (m, 1H), 1,93 (m, 3H), 1,74 (s, 8H), 1,60 (m, 2H).

EJEMPLO 17A

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 6A en lugar del EJEMPLO 1C en el EJEMPLO 1D.

EJEMPLO 17B

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 17B en lugar del EJEMPLO 1D en el EJEMPLO 1I.

EJEMPLO 17C

Este ejemplo se preparó utilizando ácido 4-(4-(2-(4-clorofenil)ciclohept-1-enilmetil)piperazin-1-il)benzoico, preparado como se describe en la Solicitud de

Patente de los Estados Unidos de titularidad común Nº 10/988,338, y el EJEMPLO 17B en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400MHz, DMSO-d_6) □ 9,58 (s ancho, 1H), 9,46 (*s ancho*, 1H), 8,18 (d, 1H), 8,00 (dd, 1H), 7,77 (d, 2H), 7,41 (d, 2H), 7,29 (d, 2H), 7,24 (m, 2H), 7,13 (m, 4H), 6,96 (m, 3H), 4,12 (m, 1H), 3,87 (m, 1H), 3,63 (m, 1H), 3,38 (m, 4H), 3,15 (m, 4H), 3,02 (m, 2H), 2,74 (s, 6H), 2,46 (m, 4H), 2,09 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,57 (m, 4H).

EJEMPLO 18A

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 2E y el EJEMPLO 17B en lugar del EJEMPLO 1H y el EJEMPLO 1D en el EJEMPLO 1I.

EJEMPLO 18B

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 18A y el EJEMPLO ºC en lugar del EJEMPLO 1I y el EJEMPLO 1M, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400MHz, DMSO-d_6) □ 9,60 (s ancho, 1H), 9,47 (s ancho, 1H), 8,18 (d, 1H), 7,99 (dd, 1H), 7,77 (d, 2H), 7,41 (d, 2H), 7,30 (d, 2H), 7,24 (m, 2H), 7,15 (m, 3H), 7,12 (d, 1H), 6,96 (m, 3H), 6,92 (d, 1H), 4,10 (m, 1H), 3,91 (m, 2H), 3,60 (m, 2H), 3,37 (m, 4H), 3,15 (m, 2H), 3,02 (m, 1H), 2,74 (s, 6H), 2,25 (d, 4H), 2,08 (m, 2H), 1,71 (m, 4H).

EJEMPLO 19

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 2F en lugar del EJEMPLO 1I en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400MHz, DMSO-d_6) □ 8,11 (d, 1H), 7,93 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,36 (m, 4H), 7,27 (m, 2H), 7,18 (m, 1H), 7,12 (d, 2H), 6,97 (d, 1H), 6,85 (m, 3H), 4,05 (m, 1H), 3,53 (m, 4H), 3,23 (m, 1H), 2,83 (m, 1H), 2,34 (m, 8H), 2,22 (m, 2H), 1,99 (m, 2H), 1,96 (m, 1H), 1,77 (m, 1H), 1,44 (t, 2H), 0,97 (s, 6H).

EJEMPLO 20

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 17B en lugar del EJEMPLO 1I en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) □ 9,46 (s ancho, 1H), 8,18 (d, 1H), 7,99 (dd, 1H), 7,76 (d, 2H), 7,40 (d, 2H), 7,29 (d, 2H), 7,23 (t, 2H), 7,14 (s, 4H), 6,95 (m, 3H), 4,11 (m, 1H), 3,88 (m, 2H), 3,58 (m, 4H), 3,08 (m, 4H), 2,73 (s, 6H), 2,27 (m, 2H), 2,08 (m, 2H), 2,02 (s, 2H), 1,47 (t, 2H), 1,00 (s, 6H).

EJEMPLO 21

Este ejemplo se preparó utilizando ácido 4-(4-(4-(4-clorofenil)-5,6-dihidro-2H-piran-3-ilmetil)piperazin-1-il)benzoico, preparado como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de titularidad común Nº 10/988,338, en lugar del EJEMPLO 1M en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) □ 8,27 (d, 1H), 8,11 (d, 1H), 7,89 (d, 2H), 7,59 (d, 2H), 7,48 (m, 4H), 7,37 (m, 3H), 7,13 (m, 1H), 7,01 (m, 3H), 4,35 (s, 2H), 4,24 (m, 1H), 3,97 (m, 2H), 3,68 (m, 4H), 3,36 (m, 6H), 3,07 (m, 3H), 2,68 (s, 2H), 2,59 (m, 4H), 2,14 (m, 2H), 1,93 (m, 2H).

EJEMPLO 22A

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 4E en lugar del EJEMPLO 2E en el EJEMPLO 2F.

EJEMPLO 22

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 2K y el EJEMPLO 22A en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) □ 9,21 (s ancho, 1H), 8,17 (m, 1H), 8,00 (dd, 1H), 7,77 (d, 2H), 7,42 (m, 2H), 7,31 (m, 2H), 7,24 (m, 2H), 7,14 (m, 4H), 6,97 (m, 3H), 4,11 (m, 1H), 3,90 (m, 1H), 3,12 (m, 6H), 2,84 (m, 3H), 2,63 (m, 3H), 2,25 (m, 2H), 2,07 (m, 4H), 1,49 (t, 2H), 1,16 (m, 6H), 0,97 (s, 6H).

EJEMPLO 23

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 22A en lugar del EJEMPLO 1I en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) □ 9,21 (s ancho, 1H), 8,18 (m, 1H), 7,99 (dd, 1H), 7,78 (d, 2H), 7,40 (d, 2H), 7,30 (d, 2H), 7,24 (m, 2H), 7,15 (m, 4H), 6,97 (m, 3H), 4,11 (m, 1H), 3,89 (m, 1H), 3,13 (m, 6H), 2,84 (m, 2H), 2,63 (m, 3H), 2,28 (m, 2H), 2,07 (m, 4H), 1,48 (t, 2H), 1,17 (m, 6H), 1,00 (s, 6H).

EJEMPLO 24

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 2K en lugar del EJEMPLO 1M en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) □ 12,14 (s ancho, 1 H), 9,89 (s ancho, 1H), 9,52 (s, 1H), 8,18 (d, 1H), 8,00 (dd, 1H), 7,77 (d, 2H), 7,41 (d, 2H), 7,30 (d, 2H), 7,24 (t, 2H), 7,14 (m, 4H), 6,96 (m, 3H), 4,12 (m, 1H), 3,93 (m, 3H), 3,63 (m, 4H), 2,93 (m, 10H), 2,24 (m, 2H), 2,09 (m, 4H), 1,48 (t, 2H), 0,97 (s, 6H).

EJEMPLO 25

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 2K y el EJEMPLO 6F en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) □ 9,58 (s ancho, 1H), 9,39 (s ancho, 1H), 8,17 (s, 1H), 7,99 (dd, 1H), 7,77 (d, 2H), 7,41 (d, 2H), 7,30 (d, 2H), 7,24 (t, 2H), 7,14 (m, 4H), 6,97 (m, 3H), 4,63 (d, 1H), 4,43 (d, 1H), 4,13 (m, 1H), 3,92 (m, 2H), 3,69 (m, 2H), 3,52 (m, 2H), 3,01 (m, 6H), 2,25 (m, 2H), 2,04 (m, 6H), 1,49 (m, 2H), 0,98 (s, 6H).

EJEMPLO 26

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 17B y el EJEMPLO °C en lugar del EJEMPLO 1I y el EJEMPLO 1M, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) □ 9,49 (s ancho, 1H), 8,08 (d, 1H), 7,95 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,36 (m, 4H), 7,30 (t, 2H), 7,20 (t, 1H), 7,12 (d, 2H), 6,84 (m, 2H), 6,78 (d, 2H),

3,98 (m, 1H), 3,28 (m, 2H), 3,12 (s ancho, 4H), 2,81 (s ancho, 1H), 2,77 (s, 1H), 2,46 (s, 6H), 2,28 (s, 4H), 2,19 (m, 4H), 2,00 (m, 1H), 1,90 (m, 1H), 1,65 (m, 4H).

EJEMPLO 27A

Este ejemplo se preparó utilizando pirrolidina en lugar de N-isopropiletilamina en el EJEMPLO 4D.

EJEMPLO 27B

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 27A en lugar del EJEMPLO 4D en el EJEMPLO 4E.

EJEMPLO 27C

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 27B en lugar del EJEMPLO 1D en el EJEMPLO 1I.

EJEMPLO 27D

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 27C y el EJEMPLO °C en lugar del EJEMPLO 1I y el EJEMPLO 1M, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) □ 8,08 (d, 1H), 7,96 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,36 (m, 4H), 7,30 (t, 2H), 7,20 (t, 1H), 7,12 (d, 2H), 6,87 (m, 1H), 6,77 (d, 2H), 6,72 (d, 1H), 4,00 (m, 1H), 3,26 (m, 2H), 3,12 (s ancho, 4H), 2,97 (m, 6H), 2,76 (s, 1H), 2,28 (s ancho, 4H), 2,19, (m, 4H), 2,05 (m, 1H), 1,95 (m, 1H), 1,82 (s ancho, 4H), 1,65 (m, 4H).

EJEMPLO 28

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 2K y el EJEMPLO 17B en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) □ 9,59 (s ancho, 1H), 8,08 (d, 1H), 7,94 (dd, 1H), 7,70 (d, 2H), 7,36 (m, 4H), 7,30 (t, 2H), 7,21 (tt, 1H), 7,09 (d, 2H), 6,83 (d, 1H), 6,78 (d, 3H), 3,97 (m, 1H), 3,28 (m, 2H), 3,13 (s ancho, 4H), 2,90 (s ancho, 2H), 2,79 (s, 2H), 2,55

(s, 6H), 2,28 (s ancho, 4H), 2,20 (m, 2H), 1,99 (s, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,42 (t, 2H), 0,96 (s, 6H).

EJEMPLO 29

Este ejemplo se preparó utilizando ácido 4-(4-(2-(4-clorofenil)ciclo-1-enilmetil)piperazin-1-il)benzoico, preparado como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de titularidad común Nº 10/988,338, y el EJEMPLO 2ºC en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) □ 9,60 (s ancho, 1H), 8,08 (d, 1H), 7,94 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,36 (m, 4H), 7,30 (t, 2H), 7,20 (t, 1H), 7,09 (d, 2H), 6,83 (d, 1H), 6,77 (d, 3H), 3,99 (m, 1H), 3,26 (m, 2H), 3,12 (s ancho, 4H), 2,80 (m, 5H), 2,76 (s, 2H), 2,40 (m, 4H), 2,31 (s ancho, 4H), 1,99 (m, 1H), 1,89 (m, 1H), 1,77 (s ancho, 6H), 1,58 (m, 2H), 1,51 (m,.2H).

EJEMPLO 30A

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 2E y el EJEMPLO 27B en lugar del EJEMPLO 1H y el EJEMPLO 1D en el EJEMPLO 1I.

EJEMPLO 30B

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 30A en lugar del EJEMPLO 1I y el EJEMPLO 1D en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) □ 9,57 (s ancho, 1H), 8,07 (d, 1H), 7,93 (dd, 1H), 7,70 (d, 2H), 7,36 (m, 4H), 7,30 (t, 2H), 7,21 (t, 1H), 7,12 (d, 2H), 6,81 (d, 1H), 6,77 (d, 3H), 3,99 (m, 1H), 3,26 (m, 2H), 3,12 (s ancho, 4H), 2,80 (m, 5H), 2,76 (s, 2H), 2,27 (m, 4H), 2,22 (m, 2H), 1,99 (m, 3H), 1,88 (m, 1H), 1,77 (s ancho, 4H), 1,43 (t, 2H), 0,97 (s, 6H).

EJEMPLO 31

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 2K y el EJEMPLO 30A en

lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) □ 9,52 (s ancho, 1H), 8,06 (d, 1H), 7,92 (dd, 1H), 7,70 (d, 2H), 7,36 (m, 4H), 7,30 (t, 2H), 7,21 (t, 1H), 7,08 (d, 2H), 6,81 (d, 1H), 6,77 (d, 3H), 3,99 (m, 1H), 3,26 (m, 2H), 3,12 (s ancho, 4H), 2,76 (s, 2H), 2,75 (m, 5H), 2,26 (m, 4H), 2,20 (m, 2H), 1,99 (m, 3H), 1,86 (m, 1H), 1,76 (s ancho, 4H), 1,42 (t, 2H), 0,96 (s, 6H).

EJEMPLO 32

Este ejemplo se preparó utilizando ácido 4-(4-(2-(4-clorofenil)ciclohept-1-enilmetil)piperazin-1-il)benzoico, preparado como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de titularidad común Nº 10/988,338, y el EJEMPLO 30A en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) □ 9,50 (s ancho, 1H), 8,08 (d, 1H), 7,94 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,36 (m, 4H), 7,30 (t, 2H), 7,20 (t, 1H), 7,09 (d, 2H), 6,83 (d, 1H), 6,77 (d, 3H), 3,99 (m, 1H), 3,26 (m, 2H), 3,12 (s ancho, 4H), 2,80 (m, 5H), 2,76 (s, 2H), 2,40 (m, 4H), 2,31 (s ancho, 4H), 1,98 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 1,76 (s ancho, 6H), 1,58 (m, 2H), 1,51 (m, 2H).

EJEMPLO 33

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 4F y el EJEMPLO ºC en lugar del EJEMPLO 1I y el EJEMPLO 1M, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (300MHz, DMSO-d_6) □ 9,03 (s, 1H), 8,08 (d, 1H), 7,97 (d, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,39-7,34 (m, 4H), 7,30 (t, 2H), 7,20 (tt, 1H), 7,13 (dt, 2H), 6,88 (m, 1H), 6,78 (d, 2H), 6,70 (m, 1H), 3,99 (m, 1H), 3,37-3,26 (m, 4H), 3,12 (s, 4H), 2,76 (s, 2H), 2,68-2,53 (m, 2H), 2,34-2,13 (m, 10H), 2,10-1,95 (m, 2H), 1,66 (s, 4H), 1,13 (m, 6H).

EJEMPLO 34

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 2K y el EJEMPLO 2ºC en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (300MHz, DMSO-d_6) □ 9,53 (s, 1H), 8,08 (d, 1H), 7,97 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,40-7,34 (m, 4H), 7,30 (t, 2H), 7,20 (tt, 1H), 7,09 (d, 2H), 6,89 (d, 1H), 6,78 (d, 2H), 6,71 (d, 1H), 4,01 (m, 1H), 3,38-3,27 (m, 4H), 3,20-2,84 (m, 10H), 2,79 (s, 2H), 2,27 (s, 4H), 2,20 (t, 2H), 2,03 (m, 2H), 1,85 (m, 4H), 1,42 (t, 2H), 0,96 (s, 6H).

EJEMPLO 35

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 3C y el EJEMPLO 30A en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d6) □ ppm 8,06 (d, 1H), 7,93 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,36 (m, 4H), 7,30 (m, 2H), 7,21 (m, 1H), 7,12 (d, 2H), 6,81 (d, 1H), 6,77 (d, 3H), 3,97 (m, 1H), 3,26 (m, 4H), 3,12 (s, 4H), 2,78 (m, 6H), 2,27 (s, 4H), 2,18 (m, 4H), 1,99 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 1,76 (s, 4H), 1,66 (s, 4H).

EJEMPLO 36

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 2K y el EJEMPLO 9A en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) □ 8,09 (d, 1H), 7,97 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,33 (m, 6H), 7,21 (m, 1H), 7,08 (d, 2H), 6,87 (m, 1H), 6,78 (m, 3H), 3,99 (m, 1H), 3,14 (m, 4H), 2,95 (m, 1H), 2,80 (m, 3H), 2,58 (s, 6H), 2,28 (m, 4H), 2,20 (m, 2H), 1,99 (m, 4H), 1,42 (t, 2H), 0,96 (s, 6H).

EJEMPLO 37

Este ejemplo se preparó utilizando el EJEMPLO 2K y el EJEMPLO 17B en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) □ 8,09 (d, 1H), 7,97 (dd, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,33 (m, 6H),

7,21 (m, 1H), 7,08 (d, 2H), 6,87 (m, 1H), 6,78 (m, 3H), 3,99 (m, 1H), 3,14 (m, 4H), 2,95 (m, 1H), 2,80 (m, 3H), 2,58 (s, 6H), 2,28 (m, 4H), 2,20 (m, 2H), 1,99 (m, 4H), 1,42 (t, 2H), 0,96 (s, 6H).

EJEMPLO 38

Este ejemplo se preparó utilizando ácido 4-(4-(1,1'-bifenil-2-ilmetil)-1-piperazinil)benzoico, preparado como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de titularidad común Nº 10/988,338, en lugar del EJEMPLO 1M y el EJEMPLO 17B en lugar del EJEMPLO 1I, respectivamente, en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400MHz, DMSO-d_6) □ 8,19 (d, 1H), 7,99 (dd, 1H), 7,76 (d, 3H), 7,52 (d, 4H), 7,40 (d, 2H), 7,35 (m, 1H), 7,30 (d, 2H), 7,24 (t, 2H), 7,16 (t, 2H), 6,96 (m, 3H), 4,25 (ancho, 2H), 4,12 (m, 1H), 3,37 (m, 2H), 3,14 (m, 1H), 3,10 (ancho, 8H), 2,74 (s, 6H), 2,10 (m, 2H).

EJEMPLO 39

Este ejemplo se preparó utilizando ácido 4-(4-(1,1'-bifenil-2-ilmetil)-1-piperazinil)benzoico, preparado como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de titularidad común Nº 10/988,338, en lugar del EJEMPLO 1M en el EJEMPLO 1N. ^{1}H RMN (400MHz, DMSO-d_6) δ 8,19 (d, 1H), 8,00 (dd, 1H), 7,76(d, 2H), 7,52 (m, 5H), 7,14 (m, 8H), 6,96 (m, 3H), 4,29 (m, 2H), 4,14 (m, 2H), 4,02 (m, 1H), 3,10 (m, 8H), 2,13 (m, 2H).

Ejemplo 40

Anticuerpos

Todos los anticuerpos se compraron de fuentes comerciales como sigue: los anticuerpos contra INCENP, histona H3, histona H3-(pSer^{10}), BIK, PUMA, y BAK

fueron de Cell Signaling Technology; los anticuerpos contra Aurora B, Bad, y Ral-A fueron de Epitomics; los anticuerpos contra Aurora A, p53, citocromo C, Bid, y Bim fueron de BD Biosciences; los anticuerpos contra Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, y S6K1 fueron de Santa Cruz Biotechnology; los anticuerpos contra BAX fueron de Abcam; los anticuerpos contra NOXA fueron de Imgenex; los anticuerpos contra el confórmero activo de BAX (6A7) fueron de Sigma; los anticuerpos contra el confórmero activo de BAK (Ab2) fueron de Calbiochem; los anticuerpos contra β-actina fueron de R&D systems.

Moléculas pequeñas y ARNpis

Los componentes activos de las drogas clínicas BCNU, Doxorubicina, Gemcitabina, Etopósido, 5-FU, ALIMTA, Rapamicina, y los componentes previamente divulgados de Abbott, ABT-751 (inhibidor de β-tubulina), ABT-888 (inhibidor de PARP) (Véase, Donawho, C.K. y col., "ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models," *Clin Cancer Res* 13, 2728-37 (2007)), ABT-263 (inhibidor de la familia de proteínas Bcl-2) (Véase, Tse, C. y col., "ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor," *Cancer Res* 68, 3421-8 (2008)), Ritonavir (Véase, Kempf, D.J. y col., "Discovery of ritonavir, a potent inhibitor of HIV protease with high oral bioavailability and clinical efficacy," *J Med Chem* 41, 602-17 (1998)), A-443654 (inhibidor de AKT) (Véase, Luo, Y. y col., "Potent and selective inhibitors of Akt kinases slow the progress of tumors in vivo," *Mol Cancer Ther* 4, 977-86 (2005)), y A-407846 (histona deacetilasa) (Véase, Vasudevan, A. y col., "Heterocyclic ketones as inhibitors of histone deacetylase," *Bioorg Med Chem Lett* 13, 3909-13 (2003)) se obtuvieron del Compound Depository de Abbott Laboratories, el beneficiario de la presente solicitud.

17-AAG se compró en AG Scientific (San Diego, CA). Las estructuras químicas de MLN8054 (Véase, Manfredi, M.G. y col., "Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase," *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 4106-11 (2007)), AZD1152 (Véase, Mortlock, A.A. y col., "Discovery, synthesis, and in vivo activity of a new class of pyrazoloquinazolines as selective inhibitors of aurora B kinase," *J Med Chem* 50, 2213-24 (2007)), y VX-680/MK-0457 (Véase, Harrington, E.A. y col., "VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora Kinases, suppresses tumor growth in vivo," *Nat Med* 10, 262-7 (2004)) y BI 2536 se han divulgado. Estos compuestos se sintetizaron en Abbott Laboratories para propósitos comparativos. La AZD1152-hidroxiquinazolina pirazol anilida (HQPA) se convierte rápidamente desde la prodroga de fosfato diácido, AZD1152, en presencia de plasma (Véase, Mortlock, A.A. y col., "Discovery, synthesis, and in vivo activity of a new class of pyrazoloquinazolines as selective inhibitors of aurora B kinase," *J Med Chem* 50, 2213-24 (2007)). Para todos los estudios, se usó AZD1152-HQPA y se denominó como AZD1152.

Los ARNpis contra Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Aurora A, Aurora B, INCENP, BIK, NOXA, BAX, BAK, PUMA, BAD, y BIM se compraron en Dharmacon (Lafayette, CO). Para cada blanco, se pre cribó un juego de 4 ARNpis de ON-TARGET Plus para silenciamiento del objetivo y citotoxicidad fuera de objetivo. Los ARNpis que produjeron una reducción de más de 70% en la proteína blanco sin causar más de un 10% de inhibición de crecimiento no deseada en un ensayo de proliferación de 72 horas, se seleccionaron para todos los estudios relacionados con ARNpi. Se usó el ARNpi más potente contra cada blanco en los experimentos, en los que solamente se usó un ARNpi/objetivo. El ARNpi control contra ningún objetivo y un ARNpi contra

luciferasa descrito previamente (Véase, Lin, X. y col., "'Seed' analysis of off-target siRNAs reveals an essential role of Mcl-1 in resistance to the small-molecule Bcl-2/ Bcl-X_L inhibitor ABT-737," *Oncogene* 26, 3972-9 (2007)) también se compraron en Dharmacon.

Cultivo de células y estudios con animales

Las líneas celulares de cáncer humano SW620, D54MG, A549, PC3, EJ1, DLD1, HCT116, y 786-O se compraron de la American Type Culture Collection (ATCC). Todas las líneas celulares se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

Se obtuvieron ratones C.B.-17 *scid*-bg (*scid*-bg) or C.B.-17 *scid* (*scid*) de Charles River Laboratories entre 5 y 6 semanas de edad y se usaron para los estudios cuando eran mayores a 8 semanas de edad y/o ~20 g de tamaño. Todos los estudios con animales se llevaron a cabo en un ambiente libre de patógenos específicos de acuerdo con el Internal Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), acreditado por la American Association of Laboratory Animal Care bajo condiciones que cumplen lo exceden los estándares establecidos por las políticas del United States Department of Agriculture Animal Welfare Act, Public Health Service sobre cuidado humano y uso de animales, y las guías del NIH sobre cuidado de animales de laboratorio. Se usaron signos ostensibles de deshidratación, falta de acicalamiento, letargia, >15% de pérdida de peso así como también volumen tumoral >20% del peso corporal para determinar el punto final tumoral.

La línea celular tumoral HCT116 se probó rutinariamente para *Mycoplasma* y se confirmó como libre de microbios mediante prueba de amplificación por PCR para microbios infecciosos (IMPACT, Missouri Research Animal Diagnostic Laboratory)

antes de la inoculación *in vivo*. Las células se crecieron en RPMI suplementado con L-glutamina 1 mM y 10% de suero fetal bovino, se mantuvieron a 37°C en una atmosfera humidificada equilibrada con 5% de CO_2, 95% de aire y se usaron entre los pasajes 3 y 7 en fase log para la inoculación de células tumorales. Se mezclaron las células (1 x 10^6) 1:1 con matrigel (BD Biosciences) y se inyectaron *s.c.* (0,2 mL) en el flanco afeitado de ratones hembra. Los tumores se hicieron coincidir en tamaño (entre 482 y 606 mm^3) y se localizaron dentro de grupos de tratamiento antes de iniciar la dosificación. Se midieron dos diámetros bisectantes con calibre y se estimaron los volúmenes tumorales a partir de la fórmula: (longitud x ancho^2)/2. Se administró VX-680 por vía intraperitoneal (I.P., 50 mg/kg/d, *b.i.d.* hasta el final; 17 días dependiendo de cuándo se alcanzó el punto final, y se terminó el estudio) en un vehículo conteniendo 10% de Solutol (BASF, Florham Park, NJ) y 90% de ácido tartárico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se administró AZD1152 I.P. (100 mg/kg/d, *b.i.d.*x3) en un vehículo conteniendo 2% de etanol, 5% de Tween-80, 20% de PEG-400, 73% de HPMC (Sigma-Aldrich). Se administró ABT-263 PO, 75 o 100 mg/kg/d, q.d. x entre 13 y 17 días en un vehículo conteniendo 60% de Phosal 50, 30% de PEG 400, 10% de etanol. Los agentes se dosificaron inicialmente en forma concurrente en terapias de combinación por la duración indicada.

Transfecciones de ARNpi

Típicamente, se sembraron las células a 5.000/pocillo en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento libre de antibiótico y se cultivaron durante una noche. Al día siguiente, se transfectaron las células con oligos de ARNpi usando el reactivo de transfección Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) o DharmaFECT de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se transfectaron los ARNpis individuales a una

concentración final de 10 nM. Para los experimentos de inmunotransferencia, se cultivaron las células por otros 3 días, luego se prepararon los lisados. Para las combinaciones de ARNpi/dorga, se trataron las células con compuesto 24 horas después de la transfección, luego se cultivaron durante otras 72 horas. Para la poliploidización a largo plazo, las células se cultivaron por hasta 10 días después de la transfección.

Ensayo de viabilidad celular y ensayos de caspasa 3/7

La viabilidad celular se determinó usando el ensayo de luminiscencia CellTiter-GLO (Promega) de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante. En general, se sembraron las células a >90% de viabilidad (según la determinación mediante exclusión de azul de tripán) en placas de 96 pocillos durante una noche, se trataron con compuesto o ARNpis por la duración indicada, y se determinó la viabilidad celular global mediante medida de luminiscencia.

La actividad de caspasa-3 se determinó usando el Caspase-GLO 3/7 Assay (Promega) en tándem con el ensayo de viabilidad CellTiter-GLO (Promega). Se llevaron a cabo experimentos en paralelo, en donde en un experimento se midió la actividad de Caspasa-3/7 y en el otro, se determinó la viabilidad celular. Como la actividad de Caspase-3/7 en sí misma refleja tanto la actividad específica de la enzima Caspasa-3 como el número de células viables, los datos se expresaron como actividad de Caspasa-3/7 dividido por la viabilidad celular.

Inmunotransferencia e inmunoprecipitación

Los lisados celulares se prepararon o bien usando una solución amortiguadora de lisis con CHAPS (HEPES10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 1% de CHAPS) o bien una solución amortiguadora de extracción celular con 1% de Tritón X-100, 0,1% de SDS, y

0,5% de desoxicolato (Invitrogen). Todas las soluciones amortiguadoras se suplementaron con mezclas inhibidoras de proteasa y fosfatasa (Sigma) antes de usar. Para la inmunotransferencia, se mezclaron los lisados con solución amortiguadora de siembra 3x (Cell Signaling Technology) y se separaron iguales cantidades de proteína mediante electroforesis en geles de Bis/Tris (Invitrogen). Para la inmunoprecipitación, se prepararon los lisados en solución amortiguadora con CHAPS y se mezclaron >4 mg de lisado celular con al menos 8 µg de anticuerpo de inmunoprecipitación durante una noche a 4°C. Al día siguiente, se agregaron 30 µl de una lechada de agarosa con Proteína A- o Proteína G durante otras 2 horas. Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces en solución amortiguadora de lisis con CHAMPS, y se calentaron en 1.5x solución amortiguadora de siembra a 95°C durante 5 minutos.

Purificación de citosol

Se lavaron aproximadamente $20x10^6$ células una vez en PBS enfriado con hielo, se tripsinizaron, y se centrifugaron durante 2 minutos a 1.300 rpm a 25°C. Se lavaron los pelets celulares una vez con PBS y se transfirieron a tubos de microcentrífuga. Se dejó que se hidrate el pelet en 200 µl en solución amortiguadora de homogeneización (HEPES 10 mM, pH 7,4, D-manitol 250 mM, EGTA 1 mM, KCl 10 mM, y $MgCl_2$ 5 mM con inhibidores de fosfatasa y proteasa) durante 30 minutos, se homogenizaron en aparato tipo *dounce* con 50 golpes usando un mortero de tipo B. Se centrifugaron los homogenatos celulares dos veces 1.000 x *g* durante 5 minutos a 4°C para peletear los desechos de núcleos celulares. Se centrifugó el sobrenadante a 10.000 x *g* durante 10 minutos a 4°C. El pelet de esta centrifugación se denominó como "mitocondria" y se extrajo adicionalmente con 80 µl de solución amortiguadora

de lisis con CHAMPS. La extracción de mitocondria se llevó a cabo en hielo mediante agitación con vórtex repetida de las muestras durante 1 minuto cada vez durante ~20 minutos. Se clarificó el extracto final mediante centrifugación a 14.000 x *g* durante 10 minutos a 4°C para eliminar cualquier desecho celular de contaminación. El sobrenadante de 10.000 x *g* conteniendo citosol y membranas de baja densidad se centrifugó nuevamente a 100.000 x g (55.000 rpm en un rotor TLA 120.2) durante 1 hora para peletear las membranas. Se designó al sobrenadante como "citosol" y se hirvió directamente en solución amortiguadora de muestras.

Determinación de interacciones droga-droga

Se determinaron las actividades sinérgicas de VX-680 y quimioagentes terapéuticos usando el modelo de adición de Bliss (Véase, Berenbaum, M.C., "Criteria for analyzing interactions between biologically active agents," *Adv Cancer Res* 35, 269-335 (1981)) en donde la respuesta combinada C de ambos agentes con efectos individuales A y B es C = A + B – (A•B) en donde A y B representan la inhibición fraccionaria entre 0 y 1. Las puntuaciones de respuesta combinada mayores a 15 se consideraron como sinérgicas.

Análisis de expresión génica mediante microarreglos

Se lisaron los pelets celulares congelados y se aisló el ARN total usando el QIAshredder y columnas RNeasy (Qiagen). Se preparó ADNc marcado de acuerdo al protocolo del fabricante del microarreglo y se hibridizó a arreglos de genoma humano U133A 2.0 (Affymetrix). Los archivos de datos de los microarreglos se cargaron en el programa Rosetta Resolver para su análisis, y se normalizaron los valores de intensidad para todos los juegos de sondas usando el Resolver's Experimental Definition. Los análisis de agrupamientos dentro de Resolver usaron el algoritmo

Agglomerative y la correlación de Pearson para la medida de similitud, usando genes que tuvieron un cambio de 1,5 veces o más en 1 condición de tratamiento. Solo se muestran las diferencias con un valor de p menor a 0,001. Para el análisis por vías metabólicas, se aplicó un corte de 1,5 veces y se usó una tasa de falso descubrimiento de 5% para el corte del valor p (Véase, Benjamini, Y. & Hochberg, Y., "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing," *J R Statist Soc B* 57, 289-300 (1995)).

Análisis por espectrometría de masa de proteínas inmunoprecipitadas

Se inmunoprecipitaron Bcl-X_L y Mcl-1 endógenas de células HCT116. Las muestras a procesar para espectrometría de masa se sembraron en pocillos separados entre sí en un gel de 10 pocillos x 1 mm de entre 4 y 12% de Bis/Tris (Invitrogen) para reducir la contaminación lateral. Se corrieron los geles a una tensión constante de 200 V en solución amortiguadora de corrida de MOPS entre 45 y 60 minutos, luego se fijaron en una solución de 50% de metanol, 7% de ácido acético durante 15 minutos. Luego de lavar con agua, se trataron los geles con tinción para geles de proteínas Sypro Ruby (Invitrogen) durante 3 horas a temperatura ambiente. Una vez completados, se destiñeron los geles en una solución de 10% de metanol, 7% de ácido acético durante 10 minutos seguido por lavado e incubación en agua durante 30 minutos. Subsiguientemente se registraron las bandas de proteína en un adquisidor de imágenes Fuji usando el canal verde.

Se cortó manualmente cada calle del gel en 24 piezas de igual tamaño, se colocaron en una placa de 96 pocillos y se cortaron en trozos. Las piezas de ge cortadas se sometieron a digestión con tripsina dentro del gel a 37°C durante 5 horas usando una unidad Perkin-Elmer MassPrep y tripsina modificada de grado para

secuenciación (6 ng/µL). Los péptidos extraídos para cada muestra se liofilizaron antes de resuspenderlos en 10 µL de una solución de 5% de acetonitrilo, 0,1% de ácido fórmico. Se inyectaron 9,5 µL de las muestras resuspendidas en una columna capilar analítica de 15 cm (I.D. 75 µm, 5 µ de tamaño de partícula, 200 Å de tamaño de poro) empaquetadas con resina de fase reversa Michrom C18AQ magic. Se eluyeron los péptidos usando una unidad Eiksigent nano-LC en un gradiente lineal de 35 minutos (15 a 35 % de acetonitrilo en 0,1% de ácido fórmico). Subsiguientemente se eliminaron los péptidos hidrofóbicos mediante el incremento de la composición de acetonitrilo de 35% a 80% en los siguientes 5 minutos. El eluyente se dirigió al orificio de un espectrómetro de masa cuadrupolar de trampa lineal (LTQ) (ThermoFisher, Waltham, MA). Se colectaron los barridos en modo de corrida doble dependientes de los datos por la duración de la separación cromatográfica.

Se buscó en cada archivo de datos de LC-MS/MS usando el Mascot Daemon v.2.2 contra la base de datos no redundante de NCBI restringida a la taxonomía de mamíferos. Se buscaron péptidos con estado de carga entre 2^+ y 3^+, con un máximo de 2 clivajes con tripsina pasados por alto, carboxiamidometilo como modificación fija, metionina oxidada como modificación variable y ventana de masa de + 1,2 Da para péptidos intactos y + 0,8 Da para iones generados a partir de espectrometría de masa en tándem. Los resultados de búsqueda en Mascot para cada archivo de datos fueron compilados por calle del gel en Scaffold v.1.0 usando la característica de compilación MudPIT para obtener identificaciones de proteína por tratamiento.

Se construyó un mapa de interactoma de la red de Bcl-2 de forma manual usando el programa Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems Redwood City, CA). Se aplicó la composición de todas las identificaciones proteicas retornadas de los

inmunoprecipitados de Bcl-X_L bajo todas las condiciones de tratamiento para el mapa de red de Bcl-2. Se analizaron de forma similar los inmunoprecipitados de Mcl-1.

Resultados

VX-680/MK-0547 y ABT-263 producen citotoxicidad sinérgica

Los inhibidores de moléculas pequeñas que tienen como blanco a la familia aurora de quinasas de serina/treonina están bajo evaluación clínica como monoterapia y sin duda se combinarán con otros quimioagentes terapéuticos. Para identificar experimentalmente agentes que se pudieran combinar terapéuticamente con inhibidores de aurora quinasa, VX-680, se cribó un inhibidor de pan-aurora, en combinación con 19 terapéuticos clínicos y experimentales para cáncer, para su efecto sobre la viabilidad celular. Se observó una única actividad sinérgica cuando se combinó VX-680 con ABT-263 (Figura 8A), una molécula pequeña disponible por vía oral mimética de BH3 que inhibe a Bcl-X_L, Bcl-2, y Bcl-w (Figura 8A). El análisis de éxito mostró que VX-680 fue sinérgico con ABT-263 en las líneas celulares tumorales sin importar el tipo histológico (por ejemplo, D54MG (glioma), NCI-H460 y A549 (carcinoma de pulmón), PC3 (carcinoma de próstata), EJ1 (carcinoma de vejiga), HCT116, DLD1, y SW620 (carcinoma de colon), y 786-O (carcinoma renal); Figura 8A-B y datos no mostrado), lo que indica que el sinergismo que se observó para estas dos clases de drogas oncológicas puede reflejar una susceptibilidad molecular dominante en células cancerígenas. En la Tabla A a continuación se resumen los blancos/mecanismos de acción de cada uno de los 19 terapéuticos clínicos y experimentales para cáncer y las correspondientes respuestas a dosis para el cribado de combinaciones.

Tabla A

		respuesta a dosis de 6 puntos (μM)					
Compuesto	**Blanco/MOA**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
ABT-263	Bcl-XL/-2	0	0,062	0,19	0,56	1,7	5,0
ABT-751	β-tubulina	0	0,062	0,19	0,56	1,7	5,0
ABT-888	PARP	0	0,062	0,19	0,56	1,7	5,0
ABT-100	farnesiltransferasa	0	0,062	0,19	0,56	1,7	5,0
Ritonavir	CYP3A4	0	0,062	0,19	0,56	1,7	5,0
A-443654	Akt	0	0,012	0,037	0,11	0,33	1,0
A-407876	histona deacetilasa	0	0,012	0,037	0,11	0,33	1,0
BI 2536	Plk1	0	0,062	0,19	0,56	1,7	5,0
Rapamicina	mTORC1	0	0,062	0,19	0,56	1,7	5,0
Etopósido	topoisomerasa II	0	0,062	0,19	0,56	1,7	5,0
Alimta	timidilato sintasa	0	0,012	0,037	0,11	0,33	1,0
17-AAG	Hsp90	0	0,012	0,037	0,11	0,33	1,0
Doxorubicina	alquilante de ADN	0	0,012	0,037	0,11	0,33	1,0
Velcade	proteasoma	0	0,0062	0,019	0,056	0,17	0,50
Gemcitabina	análogo de nucleósido	0	0,0025	0,0074	0,022	0,067	0,20
Gleevec	Abl	0	0,37	1,1	3,3	10	30
BCNU	alquilante de ADN	0	0,37	1,1	3,3	10	30
Fluorouracilo	timidilato sintasa	0	0,12	0,37	1,1	3,3	10

Vincristina	tubulina	0	0,00062	0,0019	0,0056	0,017	0,050

La actividad sinérgica de VX-680 y ABT-263 se puede atribuir totalmente a la inhibición combinada de aurora B y Bcl-X_L

VX-680 es un inhibidor potente de aurora A, B, y C quinasas con valores de $K_{i(app)}$ de 0,6, 18, y 4.6 nM, respectivamente. La inhibición de aurora A resulta primariamente en retraso o arresto mitótico (Véase, Manfredi, M.G. y col., "Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase," *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 4106-11 (2007)); mientras que la inhibición de aurora B produce una gran poliploidización (Véase, Wilkinson, R.W. y col., "AZD1152, a selective inhibitor of Aurora B kinase, inhibits human tumor xenograft growth by inducing apoptosis," *Clin Cancer Res.* 13, 3682-8 (2007)). Por lo tanto, fue importante separar del perfil de pan-aurora de VX-680 la actividad aurora quinasa que sería suficiente para el sinergismo con ABT-263. De forma similar, ABT-263 inhibe a Bcl-X_L, Bcl-2, y Bcl-w con potencias similares, mostrando valores de K_i de ≤0,5, ≤1, y ≤1 nM, respectivamente, y presenta una complicación similar. Por lo tanto, se separaron estas actividades para identificar las actividades que eran suficientes para el sinergismo usando tanto ARNpi como moléculas pequeñas selectivas. Cuando se agregó ARNpi en combinación con ABT-263, aurora B, pero no aurora A, este fue sinergicamemente antiproliferativo en combinación con ABT-263, aunque ambos ARNpis silenciaron en forma eficiente sus blancos respectivos (Figura 9A y 9B). MLN8054, un inhibidor de molécula pequeña de aurora A, no mostró sinergismo en combinación con ABT-263 (Figura 9C) a concentraciones selectivas de aurora A (<5 μM) (Véase, Manfredi, M.G. y col., "Antitumor activity of MLN8054, an orally active small molecule inhibitor of Aurora A kinase," *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 4106-11 (2007) y Li, J. y col.,

"Inhibition of Aurora B kinase sensitizes a subset of human glioma células to TRAIL concomitant with induction of TRAIL-R2," *Cell Death Differ*, Publicación electrónica previa a la escrita (2008)). Por el contrario, se observó sinergismo cuando se combinó ABT-263 con el inhibidor selectivo de aurora B, AZD1152 (Véase, Wilkinson, R.W. y col., "AZD1152, a selective inhibitor of Aurora B kinase, inhibits human tumor xenograft growth by inducing apoptosis," *Clin Cancer Res.* 13, 3682-8. (2007) y Mortlock, A.A. y col., "Discovery, synthesis, and in vivo activity of a new class of pyrazoloquinazolines as selective inhibitors of aurora B kinase," *J Med Chem* 50, 2213-24 (2007)) (Figura 9D).

Mientras que ABT-263 inhibe a Bcl-2, Bcl-X_L, y Bcl-w, el mismo es relativamente inactivo versus otros miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, tales como Mcl-1 y Bcl-A1. Debido a que Bcl-2 y Bcl-X_L comunente se expresan en muchas células de cáncer humano, se usó ARNpi para determinar cuál de los dos blancos de ABT-263, cuando están inhibidos, sería una fenocopia de la actividad sinérgica observada para ABT-263 en combinación con AZD1152. Cuando se transfectaron en células cancerígenas de diferente origen tumoral (HCT116, DLD1, EJ1, PC3, D54MG), el ARNpi para Bcl-X_L, pero no los ARNpi para luciferasa, Bcl-2, o Mcl-1, exhibió una inhibición sinérgica del crecimiento celular en combinación con AZD1152 (Figura 9E-Figura 9G y datos no mostrados). Por lo tanto, la inhibición de Bcl-X_L, pero no de Bcl-2, coopera con la inhibición de aurora B para inducir la muerte celular en estas líneas celulares. Los ARNpi para Bcl-X_L y aurora B también fueron simergicamente antiproliferativos (Figura 9H). Colectivamente, estos datos indican que la actividad sinérgica de VX-680 y ABT-263 se puede atribuir completamente a la inhibición de aurora B y Bcl-X_L.

ABT-263 dispara una apoptosis rápida en células poliploides

Como la poliploidía representa el destino celular final asociado con la inhibición sostenida de aurora B, los inventores intentaron determina si la inhibición de Bcl-X_L y la poliploidización eran citotóxicos de forma sinérgica, independientemente de aurora B. La CPC es un grupo de epistasis que comprende a aurora B, survivina, INCENP, y borealina, y está en el centro del punto de chequeo del ensamblaje del uso mitótico (Véase, Ruchaud, S., Carmena, M. & Earnshaw, W.C., "Chromosomal passengers: conducting cell division," *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 798-812 (2007)). El daño de la CPC resulta en la falla de la citocinesis y en poliploidía (Véase, Honda, R., Körner, R. & Nigg, E.A., "Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis," *Mol Biol Cell* 14, 3325-41 (2003)). De acuerdo con el rol de INCENP's como salvaguarda contra la poliploidía (Véase, Uren, A.G. y col., "Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype," *Curr Biol* 10, 1319-28 (2000)). el ARNpi contra INCENP indujo características morfológicas de poliploidía, tales como células muy agrandadas con múltiples micronúcleos (datos no mostrados). El silenciamiento de INCENP fue antiproliferativo de forma sinérgica con el silenciamiento de Bcl-X_L (Figura 10A-B), lo que sugiere que la inhibición de Bcl-XL es deletérea para las células poliploides. Sin embargo, el bombardeo de INCENP con ARNpi también deslocaliza a aurora B e inhibe su actividad (Véase, Klein, U.R., Nigg, E.A. & Gruneberg, U., "Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP," *Mol Biol Cell* 17, 2547-58 (2006)). Por lo tanto, el efecto del ARNpi contra INCENP no se puede disociar completamente del daño de aurora B. Para determinar conclusivamente si la

poliploidía *per se* era suficiente para sensibilizar a las células a la inhibición de Bcl-X_L, se trataron las células con AZD1152 para inducir poliploidía, se les lavó la droga, y se cultivaron las células poliploides hasta que se restituya la actividad de aurora B. La poliplodía se evidenció mediante expresión elevada de p53 (Figura 10C), un indicador de poliploidización en células que portan p53 de tipo salvaje (Véase, Gizatullin, F. y col., "The Aurora Kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function," *Cancer Res.* 66, 7668-77. (2006), Li, J. y col., "Inhibition of Aurora B kinase sensitizes a subset of human glioma cells to TRAIL concomitant with induction of TRAIL-R2," *Cell Death Differ*, Publicación electrónica previa a la escrita (2008) y Kojima, K., Konopleva, M., Tsao, T., Nakakuma, H. & Andreeff, M., "Concomitant inhibition of Mdm2-p53 interaction and Aurora Kinases activates the p53-dependent postmitotic checkpoints and synergistically induces p53-mediated mitochondrial apoptosis along with reduced endoreduplication in acute myelogenous leukemia," *Blood* 112, 2886-95 (2008)) y mediante el gran incremento morfológico de tamaño celular y multinucleación (Figura 10D). Después del lavado de AZD1152, la fosforilación de histona H3 retornó a los niveles sin tratar lo que indica que la actividad de aurora B se había restituido completamente (Figura 10C) en las células poliploides (Figura 10D). ABT-263 indujo la actividad de Caspasa-3 y la pérdida de viabilidad en células poliploides, pero no en células diploides, independientemente del estado de activación de aurora B (Figura 10E-F). Estos datos sugieren que la inducción aguda de poliploidía proporciona una supervivencia celular dependiente de la actividad antiapoptótica de Bcl-X_L.

La poliploidización cambia el peso de la supervivencia a Bcl-X_L

Las proteínas proapoptóticas de multidominio BAX y BAK juntas constituyen un portal obligatorio para la apoptosis (Véase, Wei, M.C. y col., "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death," *Science* 292, 727-30 (2001) y Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R. & Thompson, C.B., "BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of BAX and BAK," *Genes Dev* 15, 1481-6 (2001)). Para comenzar a dar luz sobre los mecanismos a través de los que la neutralización de Bcl-X_L produce la muerte celular en células poliploides, se examinó la actividad de BAX y BAK en células hechas poliploides con AZD1152 usando anticuerpos que reconocen selectivamente a los confórmeros activos de BAX y BAK. El agregado de ABT-263 a las células poliploides HCT116, D54MG, SW620, y EJ1 indujo rápidamente y de forma sinérgica la activación de BAX y BAK (Figura 11A y Figura 14). La activación de BAX y BAK fue seguida por la liberación mitocondrial de citocromo C al citosol, un evento decisivo en el camino a la apoptosis (Figura 11B).

La función proapoptótica de BAX y BAK normalmente se inhibe mediante los miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 tales como Bcl-X_L y Mcl-1, y es el balance entre las interacciones entre BH3 solo y proteínas multidominios el que establece el umbral para la apoptosis a través de la vía intrínseca (Véase, Kim, H. y col., "Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies," *Nat Cell Biol* 8, 1348-58 (2006) y Willis, S.N. y col., "Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not BAX or BAK," *Science* 315, 856-9 (2007)). Contrariamente a lo que se observó en células poliploides, la neutralización de Bcl-X_L no es normalmente suficiente para disparar la apoptosis en células diploides o aneuploides (Figura 8C). Para dilucidar cómo la poliploidización

utiliza los elementos de la maquinaria apoptótica y proporciona una supervivencia de células poliploides dependiente de Bcl-X_L, se monitoreó la red de Bcl-2 a nivel de ARNm y proteico en respuesta a la poliploidización. El agrupamiento jerárquico de genes de la red de Bcl-2 indicó que los perfiles transcripcionales de poliploidización (VX-680 y AZD1152) eran consistentemente más similares en comparación con la inhibición de aurora A (MLN8054), a pesar de que los mismos diferían a lo largo de las líneas celulares (Figura 15). A nivel de las proteínas, aumentó la expresión de un número de proteínas proapoptóticas solo BH3 luego de la poliploidización (Figura 11C). Un incremento de PUMA y NOXA fue un efecto conservado a través de las líneas celulares; mientras que, tBID, BIK, BIM, y BAX se incrementaron en una forma dependiente de la línea celular. A pesar de que se observaron solo cambios pequeños en la expresión para Bcl-2 y Bcl-X_L, Mcl-1 se redujo significativamente en las células HCT116, SW620, y EJ1 (Figura 11C y datos no mostrados). NOXA se une e inhibe la función antiapoptótica de Mcl-1 (Véase, Chen, L. y col., "Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function," *Mol Cell* 17, 393-403 (2005)). Por lo tanto, se predice que el aumento de expresión de NOXA en D54MG antagoniza a Mcl-1, a pesar de que no se redujo la abundancia de Mcl-1 en las células D54MG (Figura 11C). Colectivamente, la poliploidización indujo a efectores de apoptosis mientras que comprometió la función de Mcl-1. Debido a que la viabilidad celular se mantiene durante este periodo de poliploidización, se infirió que la carga de soportar la viabilidad pasa de Mcl-1 a Bcl-X_L.

Mientras que la expresión génica representa un nivel al cual está regulada la red de Bcl-2, la colección de eventos de unión entre proteínas pro- y antiapoptóticas determina finalmente el balance entre supervivencia y apoptosis. Los interactomas de

Bcl-X_L y Mcl-1 se definieron empíricamente y se monitoreó el efecto de la poliploidización sobre estas interacciones. Se trataron células HCT116 con DMSO, ABT-263, AZD1152, o AZD1152 y ABT-263. Luego se inmunoprecipitó la Bcl-X_L o Mcl-1 endógenas, y se analizaron los complejos inmunes mediante digestión con tripsina dentro del gel y LC-MS/MS. Se compilaron las identificaciones proteicas para todos los tratamientos dando una composición de interactoma que representa a todas las interaciones de Bcl-X_L y Mcl-1 detectadas (Figura 16). Las interacciones se confirmaron subsiguientemente mediante coinmunoprecipitación e inmunotransferencia bajo cada condición de tratamiento (Figura 11D-E). Ninguna de las proteínas coinmunoprecipitadas se detectó en inmunoprecipitados con anti-S6K1 usando un anticuerpos coincidente de isotipo IgG (Figura 1E-F), lo que destaca la especificidad de estas interacciones. En células poliploides (AZD1152), las interacciones de Bik y tBid con Bcl-X_L se incrementaron mientras que la unión de BAD, BIM, BAX, y PUMA permaneció sin cambios (Figura 11E) lo que indica que Bcl-X_L fue cargado en forma creciente por las proteínas proapoptóticas ante la poliploidización. En consistencia con la reducción del nivel proteico de Mcl-1, se capturó una menor cantidad de Mcl-1 mediante inmunoprecipitación en células poliploides (Figura 11E). Además, hubo un incremento estequiométrico de la unión de NOXA durante la poliploidización (Figura 11E). Más aun, la asociación de Mcl-1 con Bim y Puma estuvo significativamente atenuada en las células poliploides (Figura 11E), lo que sugiere que la reducción de Mcl-1 y el incremento concomitante de NOXA fueron suficientes para neutralizar parcialmente a Mcl-1.

Identificación de los componentes de la red de Bcl-2 que se requieren para el sinergismo con Bcl-X_L/ inhibidores de aurora B

A pesar de que múltiples proteínas de la familia de Bcl-2 estuvieron moduladas por la poliploidización a los niveles de expresión y/o interacción proteína-proteína, no fue claro cuál, si es que hubo, fue esencial para la sensibilización de las células poliploides a la inhibición de Bcl-X_L. Se llevó a cabo un cribado de ARNpi enfatizando los interactomas de Bcl-X_L y Mcl-1, para identificar a los elementos de la red de Bcl-2 que, ante el silenciamiento, pudieran rescatar la viabilidad en presencia de inhibición dual de aurora B y Bcl-X_L. Se halló que múltiples ARNpis contra NOXA, BAX, y en una menor extensión, los que se direccionan a BAK, rescatan a las células poliploides de la muerte mediada por ABT-263 (Figura 12A y Figura 17). De hecho, la inhibición, mediada por ARNpi, de NOXA y BAX en diversas líneas celulares proporcionó células poliploides resistentes a la inhibición de Bcl-X_L (Figura 12B y Figura 17). Estos datos implican roles causales para NOXA y BAX en la actividad sinérgica de la inhibición de Bcl-X_L en las células poliploides.

Para entender adicionalmente en qué extensión la inhibición de Noxa protege a las células poliploides de la apoptosis mediada por ABT-263-, se compararon los interactomas de Bcl-X_L y Mcl-1 antes y después de la poliploidización en células transfectadas con un ARNpi control o contra NOXA. Como antes, se observó una reducción de la proteína Mcl-1 y un incremento estequiométrico de la unión a NOXA a Mcl-1 en las células hechas poliploides usando AZD1152 (Figura 12D). La inhibición de NOXA restituyó la unión de Puma y Bim a Mcl-1 en las células poliploides lo que indica que la capacidad de Mcl-1 para unir efectores proapoptóticos se había restituido. A pesar de que es suficiente para causar dependencia de Bcl-X_L, la inhibición de Mcl-1 durante la poliploidización parece incompleta, debido a que la apoptosis inducida por AZD1152/ABT-263 es aumentada por el silenciamiento de Mcl-

1 (Figura 19).

Apoptosis mediada por poliploidización involucra un mecanismo distinto de la inhibición dual de aurora B/ Bcl-X_L

Las células cancerígenas acumulan masa de células viables durante la poliploidización y continúan haciéndolo hasta una semana después del agregado de AZD1152. Sin embargo, 10 días después del inicio de la poliploidía, la viabilidad declina abruptamente debido a que las células sucumben ante el proceso de poliploidización (Figura 18). Para determinar si la apoptosis secundaria a poliploidización prolongada inicia el mismo, aunque retrasado, programa apoptótico que la inhibición dual de aurora B/ Bcl-X_L, se llevó a cabo un cribado de rescate adicional con ARNpi para identificar componentes de la red de Bcl-2 que, cuando se dañan funcionalmente, preserven la viabilidad a largo plazo de las células poliploides (Figura 12E). En contraste con el requerimiento predominante de BAX y NOXA para la apoptosis inducida por la combinación de AZD1152/ABT-263, los ARNpis contra BAX y BAK confieren grados similares de protección, y los ARNpis contra BIK y BID, que no fueron eficaces en el cribado de rescate anterior, protegieron a los células de la pérdida de viabilidad inducida por poliploidización (Figura 12F). Más aun, la inhibición de NOXA falló en proveer algún efecto protector en este estudio (Figura 12F).

ABT-263 aumenta la eficacia de los inhibidores de aurora quinasa in vivo

A pesar de que se ha demostrado que los inhibidores de aurora quinasa son eficaces en estudios preclínicos, la inhibición de Bcl-X_L en células poliploides tumorales puede producir una eficacia superior a los inhibidores de aurora quinasa como monoterapia. Esto se evaluó mediante la comparación de la eficacia antitumoral de tratamiento con agente solo AZD1152 con la combinación de AZD1152/ABT-263

en un estudio riguroso y terapéuticamente relevante: tumores grandes bien diferenciados (~0,5 gramos) y con la dosis máxima tolerada de AZD1152. El AZD1152 como agente individual produjo una inhibición del crecimiento tumoral significativa en el modelos de colon carcinoma en HCT116, sin embargo los tumores comenzaron a recuperarse de la terapia en una semana (evidenciado por el recrecimeinto tumoral). En contraste, el régimen de combinación de AZD1152/ABT-263 resultó en una regresión tumoral rápida y más sostenida que persistió durante al menos 2 semanas (Figura 13A). En los tumores que se pretrataron durante 3 días con AZD1152, se observó una inducción de p53, a un marcador característico de la poliploidización (Figura 6B). Se detectó el confórmero activo BAX dentro de las 4 horas de tratamiento con ABT-263 en tumores de ratones tratados con AZD1152, pero no en los tumores vírgenes, lo que refleja el inicio rápido de la apoptosis mediada por ABT-263 en células tumorales poliploides (Figura 13B).

Una persona con experiencia en el arte apreciaría rápidamente que la presente divulgación está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los objetivos y ventajas que se mencionan, así como también las inherentes a la presente. Los complejos moleculares y los métodos, procedimientos, tratamientos, moléculas, compuestos específicos que se describen en la presente son representativos de aspectos preferidos de la presente, son ejemplificativos, y no se pretende que sean limitantes del alcance de la divulgación. Será fácilmente evidente para una persona con experiencia en el arte que se pueden hacer sustituciones y modificaciones variantes a la divulgación que se divulga en la presente sin alejarse del alcance y espíritu de la divulgación.

Todas las patentes y publicaciones que se mencionan en la memoria

descriptiva son indicativas de los niveles de las personas con experiencia en el arte al que pertenece la divulgación. Todas las patentes y publicaciones se incorporan a la presente como referencia en la misma extensión como si cada publicación individual estuviese indicada como incorporada específicamente e individualmente como referencia.

La divulgación ilustrativamente descrita en este documento de manera favorable puede practicarse en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describen específicamente en este documento. De esta manera, por ejemplo, en cada caso en este documento cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente de" y "que consiste de" puede reemplazarse con cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención que en el uso de tales términos y expresiones se excluya cualesquier equivalentes de los atributos mostrados y descritos o porciones de los mismos, pero se reconoce que diversas modificaciones son posibles dentro del alcance de la divulgación reclamada. De esta manera, debe entenderse que, aunque la presente divulgación se ha descrito específicamente por aspectos preferidos y atributos opcionales, la modificación y variación de los conceptos descritos en este documento puede reordenarse por los expertos en la técnica, y que tales modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de esta divulgación como se define por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SHAH, OMAR JAMEEL

<120> TERAPIA COMBINADA PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER Y ENSAYOS DIAGNÓSTICOS PARA SU USO

<130> 7920USP1

<140> 12/630957

<141> 04-12-2009

<150> 12/120914

<151> 15-05-2008

<150> 11/432937

<151> 12-05-2006

<150> 60/718618

<151> 20-09-2005

<150> 60/680107

<151> 12-05-2005

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda peptídica sintética

<400> 1

Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Lys

1 5 10

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda peptídica sintética

<400> 2

Ile Asn Arg

1

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 3

tggttatggg atgggtgagg 20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 4

ctgctttttc tcgcccttcc 20

<210> 5

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 5

tccgaggtgc tccagttgga ggc 23

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 6

gcccggcctg ggtctttcgc 20

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 7

cttcaatttt caaatcaaac tgatc 25

<210> 8

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 8

tgaatgcttt gatttcctca cgttt 25

<210> 9

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 9

ttgcctgaac atcttggaca ttttt 25

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda peptídica sintética

<400> 10

Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Lys Ile Asn Arg

1 5 10 15

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 11

gatggacggg tccggaga 18

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 12

ctcagcccat cttcttccag 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar un paciente que sufre de cáncer, CARACTERIZADO PORQUE el método comprende los pasos de:

a) administrar a un paciente que sufre de cáncer una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente inductor de poliploidía; y

b) administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2.

2. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el al menos un agente inductor de poliploidía es un inhibidor de aurora quinasa.

3. El método de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa B.

4. El método de la reivindicación 3, en donde el inhibidor de aurora quinasa B es VX-680, AZD1152, ZM44739 o Hersperadina.

5. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 es ABT-263, ABT-737, un inhibidor selectivo para Bcl-XL o combinaciones de los mismos.

6. Una combinación de agentes terapéuticos para usar en el tratamiento de un paciente que sufre de cáncer, CARACTERIZADA PORQUE dicha combinación comprende:

a) al menos un agente inductor de poliploidía para usar para inducir poliploidización en una o más células cancerígenas en el paciente; y

b) al menos un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2.

7. La combinación de la reivindicación 6, CARACTERIZADA PORQUE el

al menos un agente inductor de poliploidía es un inhibidor de aurora quinasa.

8. La combinación de la reivindicación 7, CARACTERIZADA PORQUE el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa B.

9. La combinación de la reivindicación 8, CARACTERIZADA PORQUE el inhibidor de aurora quinasa B es VX-680, AZD1152, ZM44739 o Hersperadina.

10. La combinación de la reivindicación 6, CARACTERIZADA PORQUE el inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 es ABT-263, ABT-737, un inhibidor selectivo para Bcl-XL o combinaciones de los mismos.

11. Un método para clasificar un paciente para elegibilidad para tratamiento con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteína de la familia Bcl-2, CARACTERIZADO PORQUE el método comprende los pasos de:

a) proveer una muestra de prueba de un paciente;

b) determinar la presencia o ausencia de al menos una mutación en al menos un gen que se elige del grupo que consiste en: un gen BAX, un gen BAK o un gen NOXA en la muestra de prueba; y

c) clasificar al paciente como elegible para recibir tratamiento con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 en base a la presencia o ausencia de al menos una mutación como se determinó en el paso b).

12. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE el agente inductor de poliploidía es un inhibidor de aurora quinasa.

13. El método de la reivindicación 12, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa A, un inhibidor de aurora quinasa B, un inhibidor de aurora quinasa C o combinaciones de los mismos.

14. El método de la reivindicación 13, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa B.

15. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de aurora quinasa B es AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 o Hersperadina.

16. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 es ABT-263, ABT-737, un inhibidor selectivo para Bcl-XL o combinaciones de los mismos.

17. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE la muestra de prueba comprende una muestra de tejido.

18. El método de la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE la muestra de tejido comprende una muestra de sangre periférica, un tejido tumoral o un tejido sospechado como tumoral, una muestra citológica de capa delgada, una muestra de aspirado con aguja delgada, una muestra de médula ósea, una muestra de nódulo linfático, una muestra de orina, una muestra de ascitos, una muestra de lavado, una muestra de cepillado de esófago, una muestra de lavado de vejiga o pulmón, una muestra de fluido espinal, una muestra de fluido cerebral, una muestra de aspirado ductal, una muestra de descarga de pezón, una muestra de efusión pleural, una muestra de tejido congelado, una muestra de tejido embebido en parafina o un extracto o muestra procesada que se produjo de cualquiera de una muestra de sangre

periférica, un tejido tumoral o un tejido sospechado como tumoral, una muestra citológica de capa delgada, una muestra de aspirado con aguja delgada, una muestra de médula ósea, una muestra de orina, una muestra de ascitos, una muestra de lavado, una muestra de cepillado de esófago, una muestra de lavado de vejiga o pulmón, una muestra de fluido espinal, una muestra de fluido cerebral, una muestra de aspirado ductal, una muestra de descarga de pezón, una muestra de efusión pleural, una muestra de tejido recién congelado o una muestra de tejido embebido en parafina.

19. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE el paso de determinar (b) se lleva a cabo mediante hibridización *in situ*.

20. El método de la reivindicación 19, CARACTERIZADO PORQUE la hibridización *in situ* se lleva a cabo con una sonda de ácido nucleico que está marcada fluorescentemente.

21. El método de la reivindicación 20, CARACTERIZADO PORQUE la hibridización *in situ* se lleva a cabo con al menos dos sondas de ácido nucleico.

22. El método de la reivindicación 20, CARACTERIZADO PORQUE la hibridización *in situ* se lleva a cabo con una sonda de ácido nucleico peptídica.

23. El método de la reivindicación 11, en donde el paso de determinar (b) se lleva a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa.

24. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE el paciente también se está tratando con quimioterapia, radiación o combinaciones de los mismos.

25. Un método para monitorear un paciente que sufre de cáncer y que se está tratando con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteína de la

familia de Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteína de la familia Bcl-2, CARACTERIZADO PORQUE el método comprende los pasos de:

a) proveer una muestra de prueba de un paciente que sufre de cáncer y que actualmente se está tratando con al menos un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteína de la familia Bcl-2;

b) determinar la presencia o ausencia de al menos una mutación en al menos un gen que se elige del grupo que consiste en: un gen BAX, un gen BAK o un gen NOXA en la muestra de prueba; y

c) determinar si el paciente debe continuar tratándose con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 en base a la presencia o ausencia de al menos una mutación como se determinó en el paso b).

26. El método de la reivindicación 25, CARACTERIZADO PORQUE el agente inductor de poliploidía es un inhibidor de aurora quinasa.

27. El método de la reivindicación 26, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa A, un inhibidor de aurora quinasa B, un inhibidor de aurora quinasa C o combinaciones de los mismos.

28. El método de la reivindicación 27, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa B.

29. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de aurora quinasa B es AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 o

Hersperadina.

30. El método de la reivindicación 25, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 es ABT-263, ABT-737, un inhibidor selectivo para Bcl-XL o combinaciones de los mismos.

31. El método de la reivindicación 25 CARACTERIZADO PORQUE la muestra de prueba comprende una muestra de tejido.

32. El método de la reivindicación 31 CARACTERIZADO PORQUE la muestra de tejido comprende una muestra de sangre periférica, un tejido tumoral o un tejido sospechado como tumoral, una muestra citológica de capa delgada, una muestra de aspirado con aguja delgada, una muestra de médula ósea, una muestra de nódulo linfático, una muestra de orina, una muestra de ascitos, una muestra de lavado, una muestra de cepillado de esófago, una muestra de lavado de vejiga o pulmón, una muestra de fluido espinal, una muestra de fluido cerebral, una muestra de aspirado ductal, una muestra de descarga de pezón, una muestra de efusión pleural, una muestra de tejido congelado, una muestra de tejido embebido en parafina o un extracto o muestra procesada que se produjo de cualquiera de una muestra de sangre periférica, un tejido tumoral o un tejido sospechado como tumoral, una muestra citológica de capa delgada, una muestra de aspirado con aguja delgada, una muestra de médula ósea, una muestra de orina, una muestra de ascitos, una muestra de lavado, una muestra de cepillado de esófago, una muestra de lavado de vejiga o pulmón, una muestra de fluido espinal, una muestra de fluido cerebral, una muestra de aspirado ductal, una muestra de descarga de pezón, una muestra de efusión pleural, una muestra de tejido recién congelado o una muestra de tejido embebido en parafina.

33. El método de la reivindicación 25, CARACTERIZADO PORQUE el paso de determinar (b) se lleva a cabo mediante hibridización *in situ*.

34. El método de la reivindicación 33, CARACTERIZADO PORQUE la hibridización *in situ* se lleva a cabo con una sonda de ácido nucleico que está marcada fluorescentemente.

35. El método de la reivindicación 33, CARACTERIZADO PORQUE la hibridización *in situ* se lleva a cabo con al menos dos sondas de ácido nucleico.

36. El método de la reivindicación 33, CARACTERIZADO PORQUE la hibridización *in situ* se lleva a cabo con una sonda de ácido nucleico peptídica.

37. El método de la reivindicación 25, CARACTERIZADO PORQUE el paso de determinar (b) se lleva a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa.

38. El método de la reivindicación 25, CARACTERIZADO PORQUE el paciente también se está tratando con quimioterapia, radiación o combinaciones de los mismos.

39. Un método para clasificar a un paciente que tiene un cáncer que es resistente a tratamiento con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteína de la familia Bcl-2, CARACTERIZADO PORQUE el método comprende los pasos de:

a) proveer una muestra de prueba de un paciente que sufre de cáncer;

b) determinar la presencia o ausencia de al menos una mutación en al menos un gen que se elige del grupo que consiste en: un gen BAX, un gen BAK o un gen NOXA en la muestra de prueba; y

c) clasificar al paciente como en posesión de un cáncer que es resistente a tratamiento con un agente inductor de poliploidía, un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 o una combinación de un agente inductor de poliploidía y un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 en base a la presencia o ausencia de al menos una mutación que se determinó en el paso b).

40. El método de la reivindicación 39, CARACTERIZADO PORQUE el agente inductor de poliploidía es un inhibidor de aurora quinasa.

41. El método de la reivindicación 40, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa A, un inhibidor de aurora quinasa B, un inhibidor de aurora quinasa C o combinaciones de los mismos.

42. El método de la reivindicación 41, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa B.

43. El método de la reivindicación 42, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de aurora quinasa B es AZD1152, ZM447439, VX-680/MK0457 o Hersperadina.

44. El método de la reivindicación 39, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 es ABT-263, ABT-737, un inhibidor selectivo para Bcl-XL o combinaciones de los mismos.

45. El método de la reivindicación 39, CARACTERIZADO PORQUE la muestra de prueba comprende una muestra de tejido.

46. El método de la reivindicación 45, CARACTERIZADO PORQUE la muestra de tejido comprende una muestra de sangre periférica, un tejido tumoral o un tejido sospechado como tumoral, una muestra citológica de capa delgada, una

muestra de aspirado con aguja delgada, una muestra de médula ósea, una muestra de nódulo linfático, una muestra de orina, una muestra de ascitos, una muestra de lavado, una muestra de cepillado de esófago, una muestra de lavado de vejiga o pulmón, una muestra de fluido espinal, una muestra de fluido cerebral, una muestra de aspirado ductal, una muestra de descarga de pezón, una muestra de efusión pleural, una muestra de tejido congelado, una muestra de tejido embebido en parafina o un extracto o muestra procesada que se produjo de cualquiera de una muestra de sangre periférica, un tejido tumoral o un tejido sospechado como tumoral, una muestra citológica de capa delgada, una muestra de aspirado con aguja delgada, una muestra de médula ósea, una muestra de orina, una muestra de ascitos, una muestra de lavado, una muestra de cepillado de esófago, una muestra de lavado de vejiga o pulmón, una muestra de fluido espinal, una muestra de fluido cerebral, una muestra de aspirado ductal, una muestra de descarga de pezón, una muestra de efusión pleural, una muestra de tejido recién congelado o una muestra de tejido embebido en parafina.

47. El método de la reivindicación 39, CARACTERIZADO PORQUE el paso de determinar (b) se lleva a cabo mediante hibridización *in situ*.

48. El método de la reivindicación 47, CARACTERIZADO PORQUE la hibridización *in situ* se lleva a cabo con una sonda de ácido nucleico que está marcada fluorescentemente.

49. El método de la reivindicación 47, CARACTERIZADO PORQUE la hibridización *in situ* se lleva a cabo con al menos dos sondas de ácido nucleico.

50. El método de la reivindicación 47, CARACTERIZADO PORQUE la hibridización *in situ* se lleva a cabo con una sonda de ácido nucleico peptídica.

51. El método de la reivindicación 39, CARACTERIZADO PORQUE el paso de determinar (b) se lleva a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa.

52. El método de la reivindicación 39, CARACTERIZADO PORQUE el paciente también se está tratando con quimioterapia, radiación o combinaciones de los mismos.

TERAPIA COMBINADA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER Y ENSAYOS DE DIAGNÓSTICO RELACIONADOS

RESUMEN

La presente divulgación se relaciona con una combinación de agentes terapéuticos para usar en el tratamiento de un paciente que sufre de cáncer. Además, la presente divulgación se relaciona con ensayos diagnósticos que son útiles en la clasificación de pacientes para tratamiento con uno o más agentes terapéuticos.

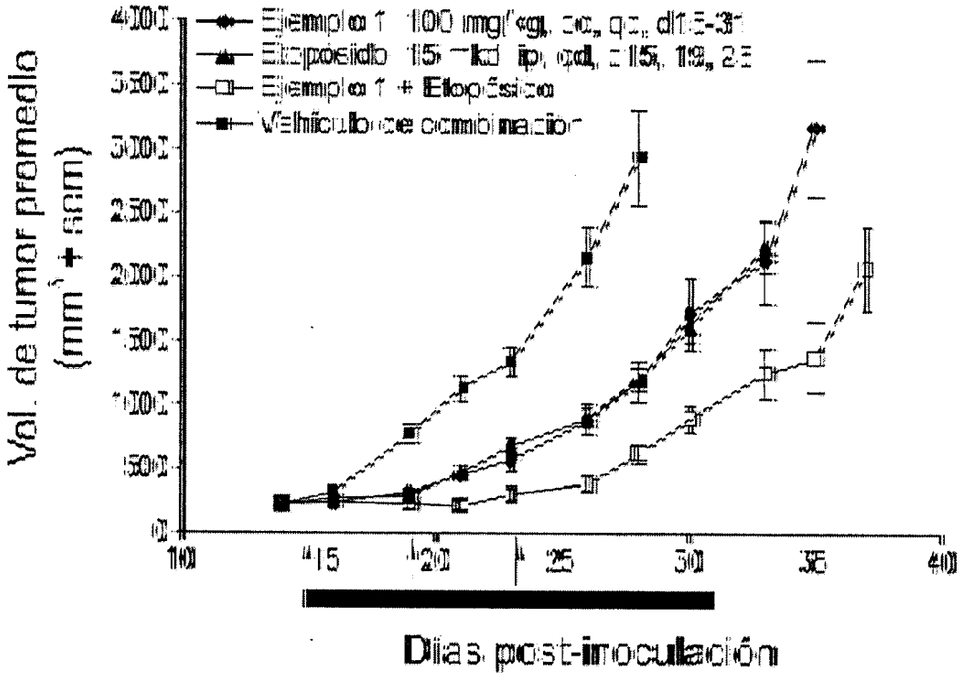

Vol. de tumor promedio
(mm³ + ssm)
Días post-inoculación
Vehículo de combinación
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
10
15
20
25
30
35
40

FIG. 1

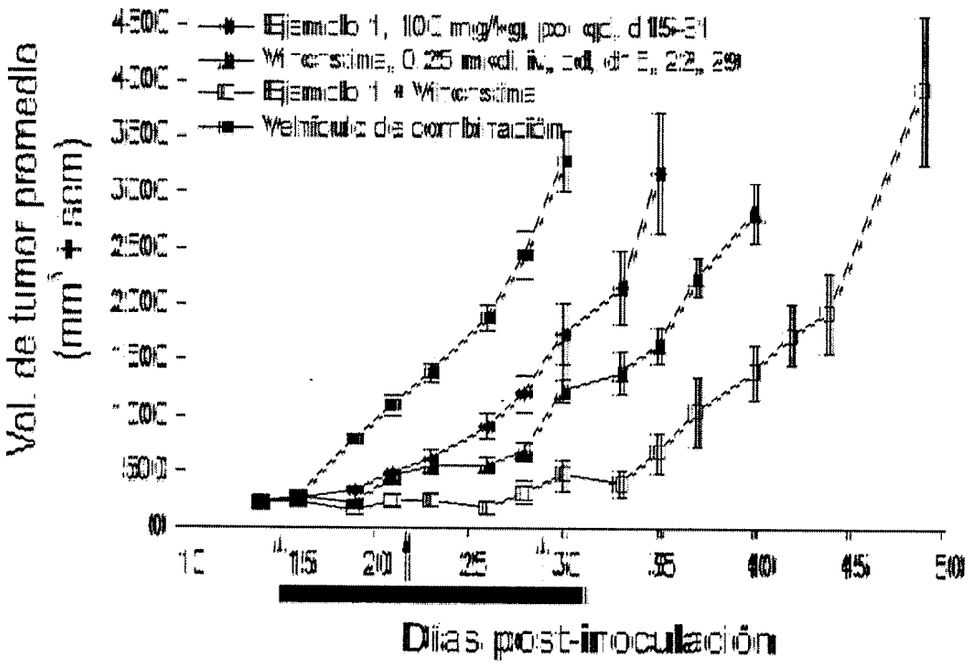

Ejemplo 1, 100 mg/kg, po, qd, d15-31
Wortmannin, 0.25 mg/kg, iv, 1qd, d15, 22, 29
Ejemplo 1 + Wortmannin
Vehículo de combinación
Vol. de tumor promedio (mm³ + sem)
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Días post-inoculación

FIG. 2

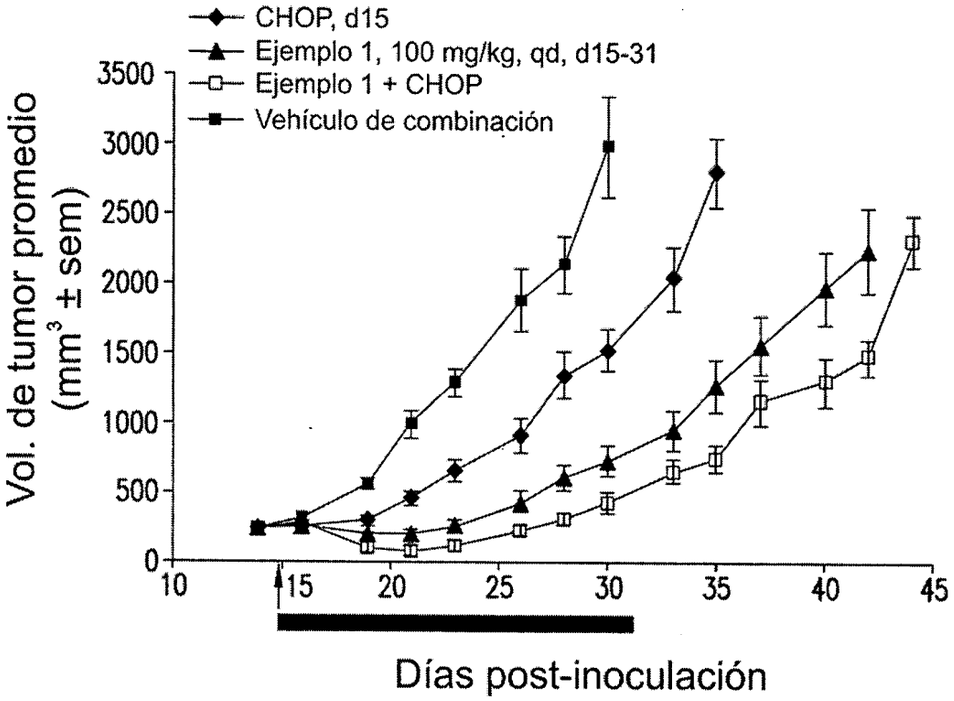

CHOP, d15
Ejemplo 1, 100 mg/kg, qd, d15-31
Ejemplo 1 + CHOP
Vehículo de combinación
Vol. de tumor promedio
(mm³ ± sem)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
15
20
25
30
35
40
45
Días post-inoculación

FIG.3

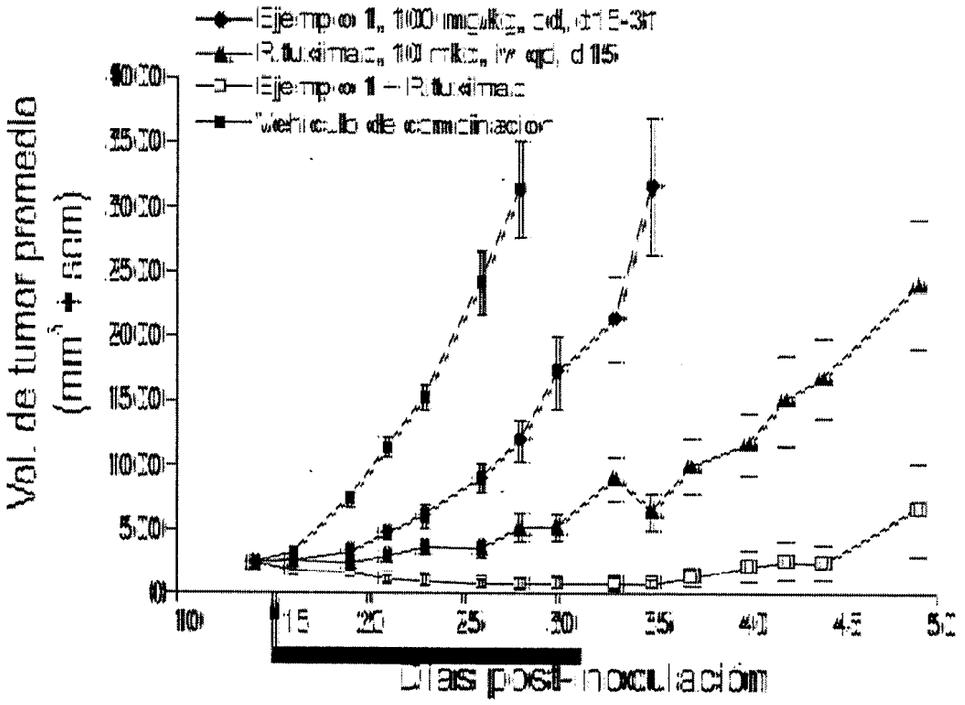

Ejemplo 1, 100 mg/kg, qd, d1-5 i.v.
Rituximab, 10 mg/kg, iv qd, d1-5
Ejemplo 1 + Rituximab
Vehículo de combinación
Vol. de tumor promedio
(mm³ + sem)
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Días post-inoculación

FIG. 4

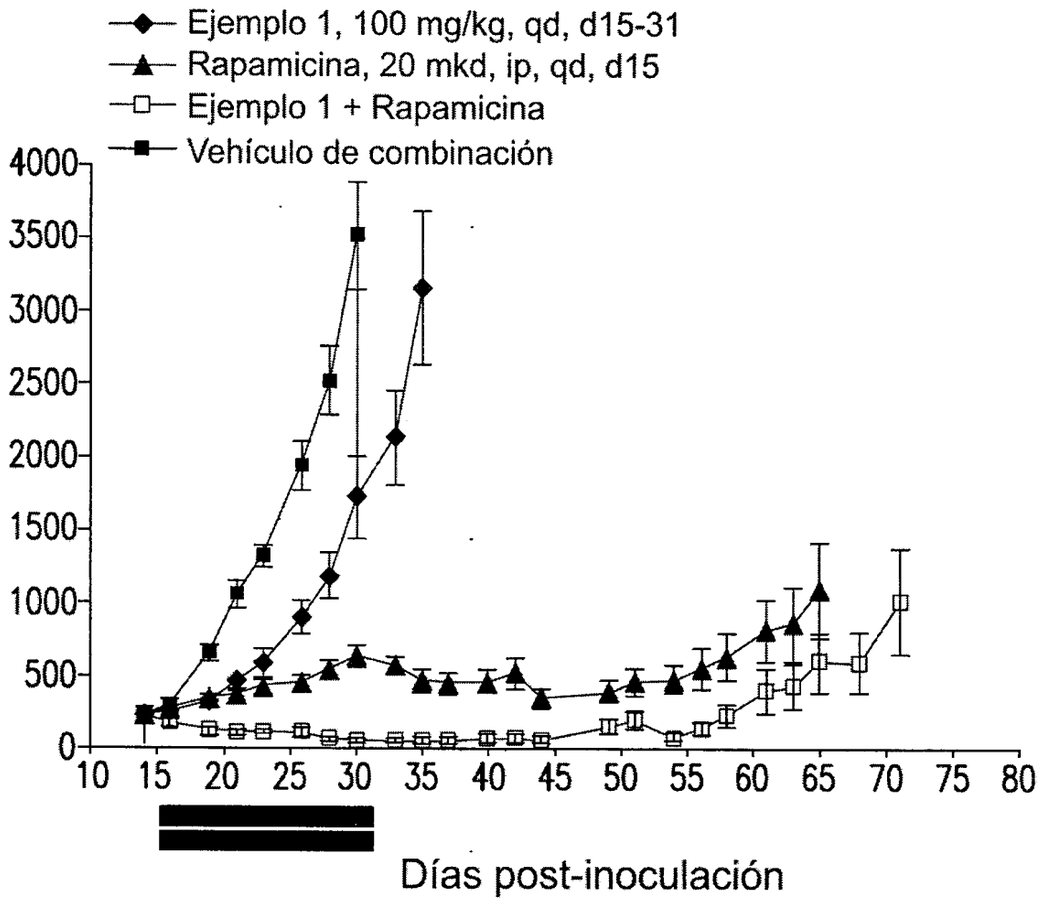

Ejemplo 1, 100 mg/kg, qd, d15-31
Rapamicina, 20 mkd, ip, qd, d15
Ejemplo 1 + Rapamicina
Vehículo de combinación
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80
Días post-inoculación

FIG.5

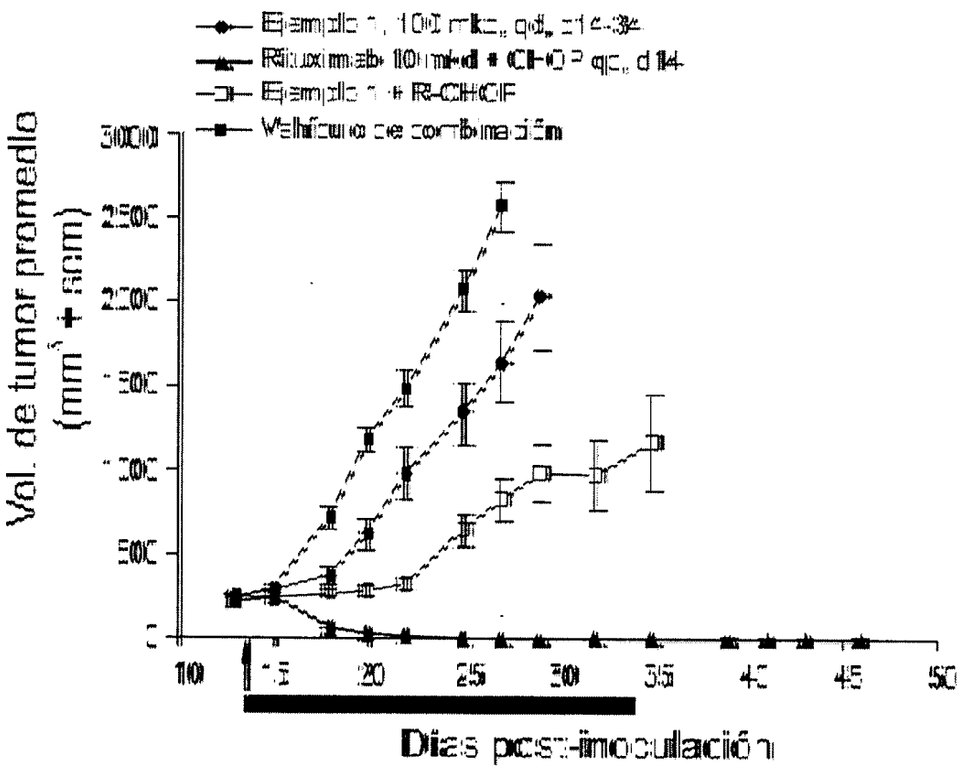


FIG.6

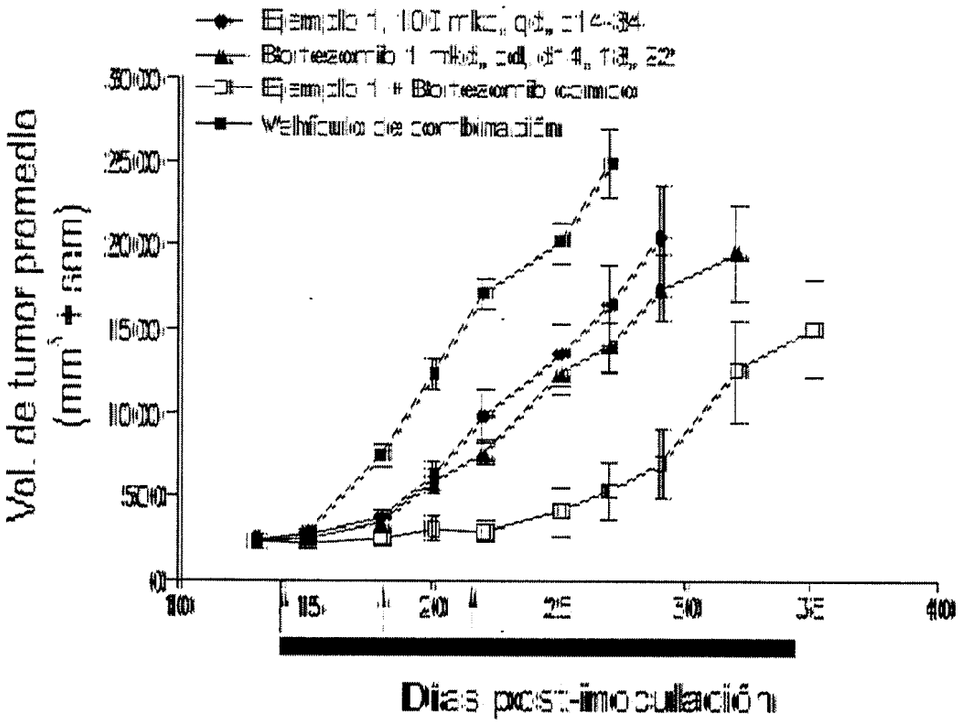

Ejemplo 1, 10 mk., qd., d14-34
Bortezomib 1 mk., iv., d1, 4, 11, 22
Ejemplo 1 + Bortezomib conjunto
Vehículo de combinación
Vol. de tumor promedio
(mm³ + sem)
50000
40000
30000
20000
10000
5000
0
100
115
200
250
300
350
400
Días post-inoculación

FIG. 7

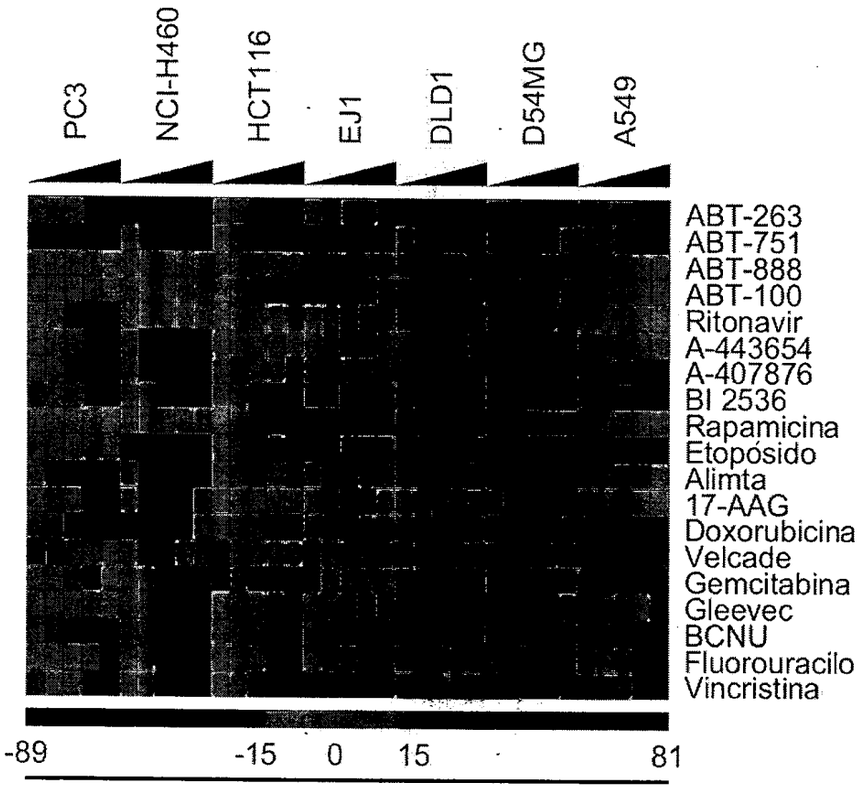

PC3
NCI-H460
HCT116
EJ1
DLD1
D54MG
A549
ABT-263
ABT-751
ABT-888
ABT-100
Ritonavir
A-443654
A-407876
BI 2536
Rapamicina
Etopósido
Alimta
17-AAG
Doxorubicina
Velcade
Gemcitabina
Gleevec
BCNU
Fluorouracilo
Vincristina
-89
-15
0
15
81
Exceso sobre aditivismo de Bliss

FIG.8A

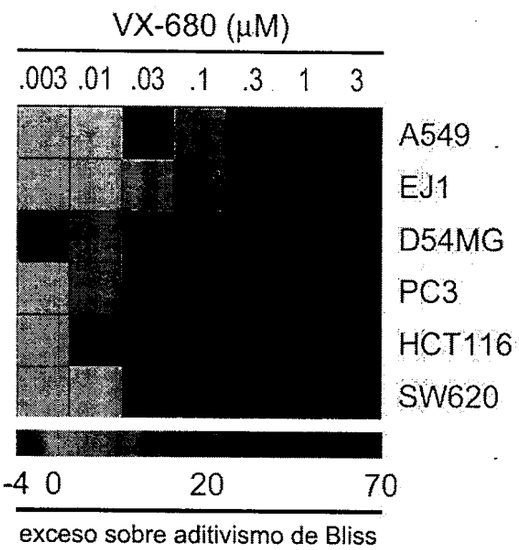

VX-680 (μM)
.003 .01 .03 .1 .3 1 3
A549
EJ1
D54MG
PC3
HCT116
SW620
-4 0
20
70
exceso sobre aditivismo de Bliss

FIG.8B

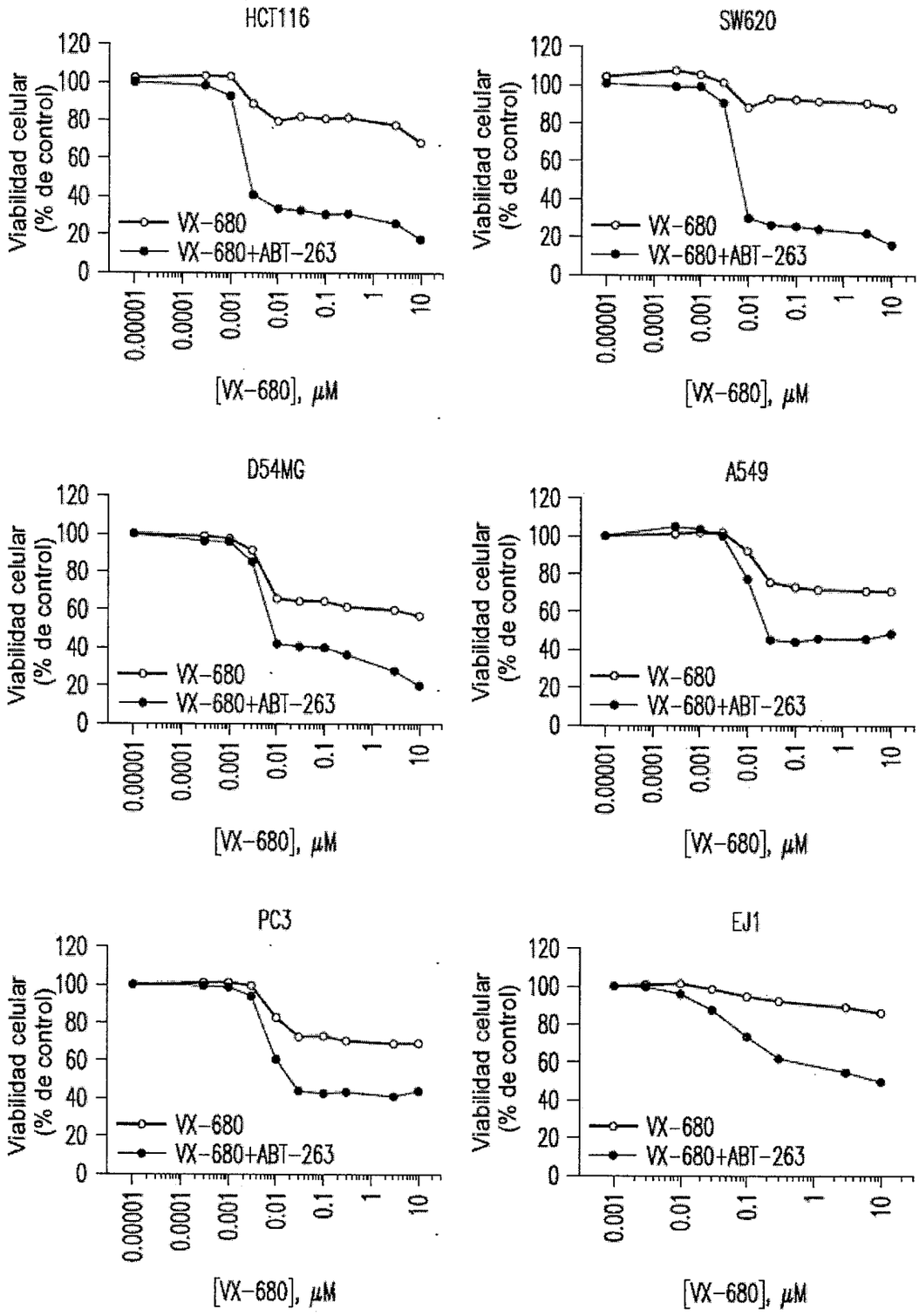

HCT116
SW620
D54MG
A549
PC3
EJ1
Viabilidad celular (% de control)
VX-680
VX-680+ABT-263
[VX-680], μM
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10

FIG.8C

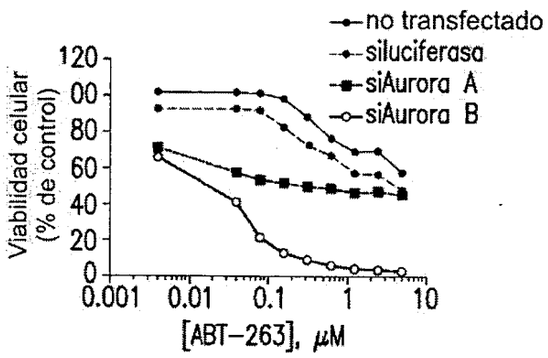


FIG.9A

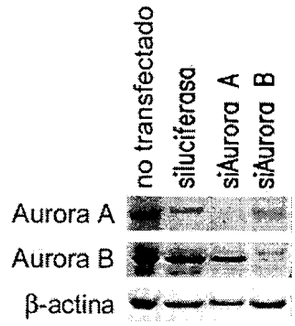


FIG.9B

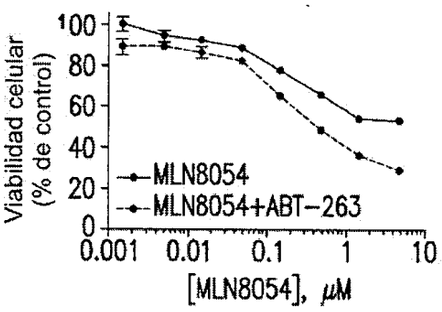


FIG.9C

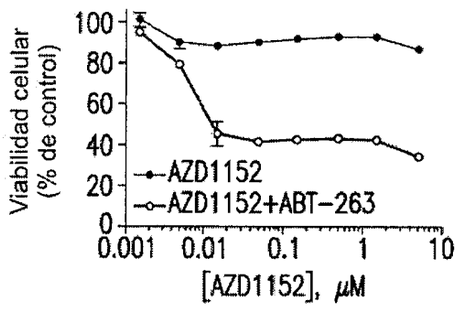


FIG.9D

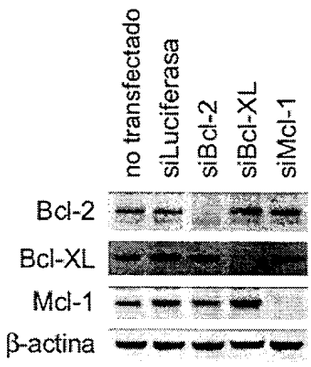


FIG.9E

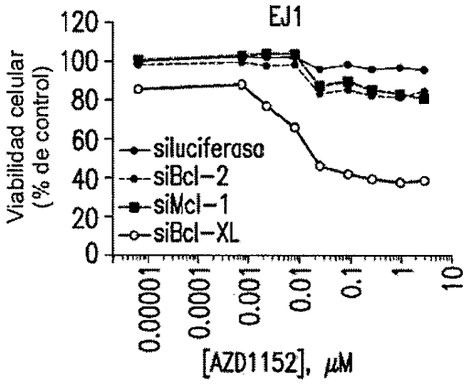


FIG.9F

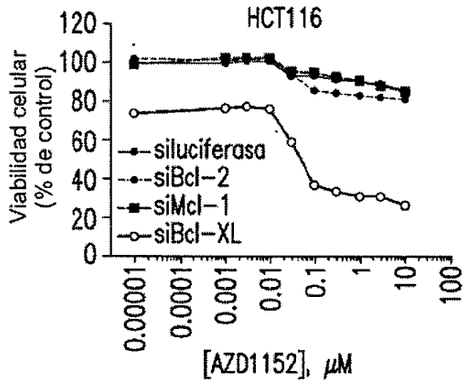


FIG.9G

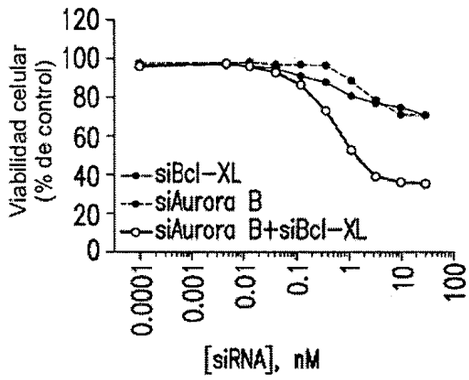


FIG.9H

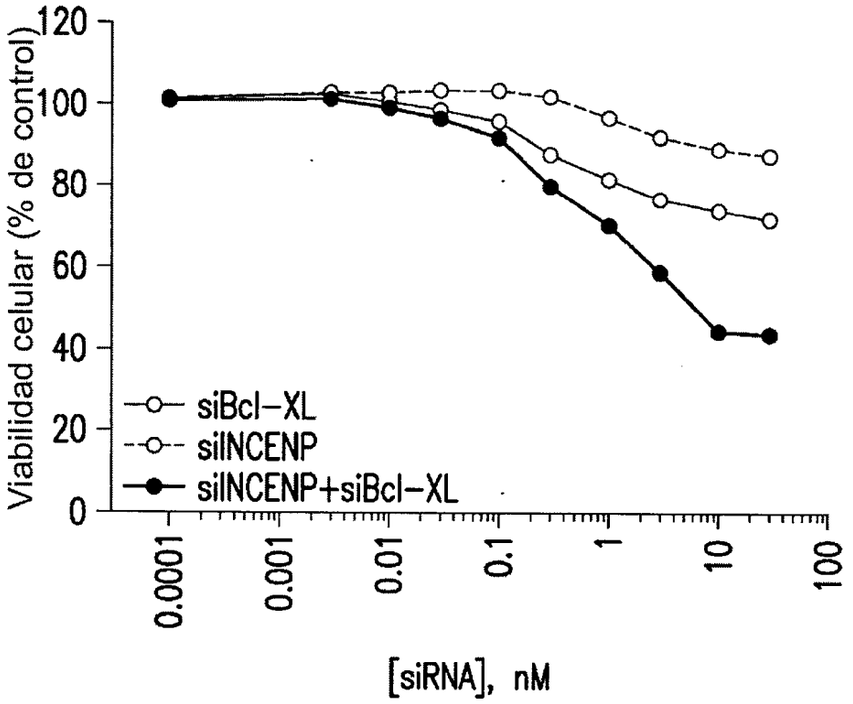


FIG.10A

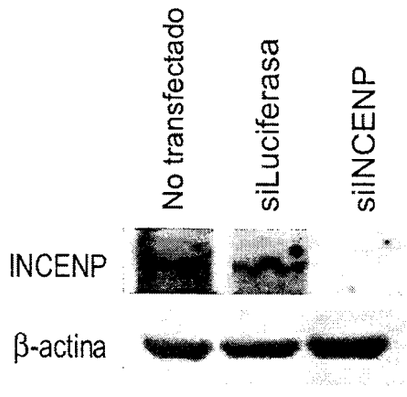


FIG.10B

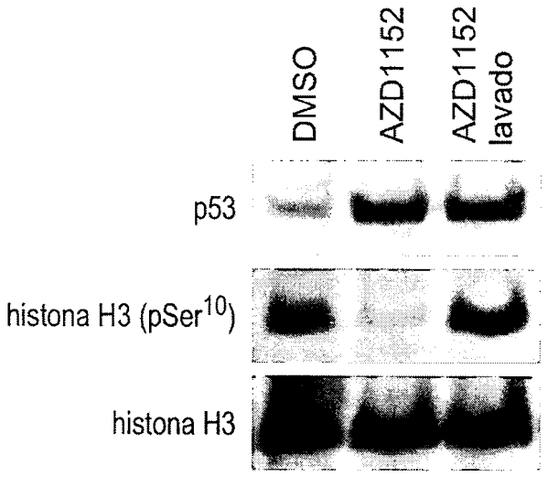


FIG.10C

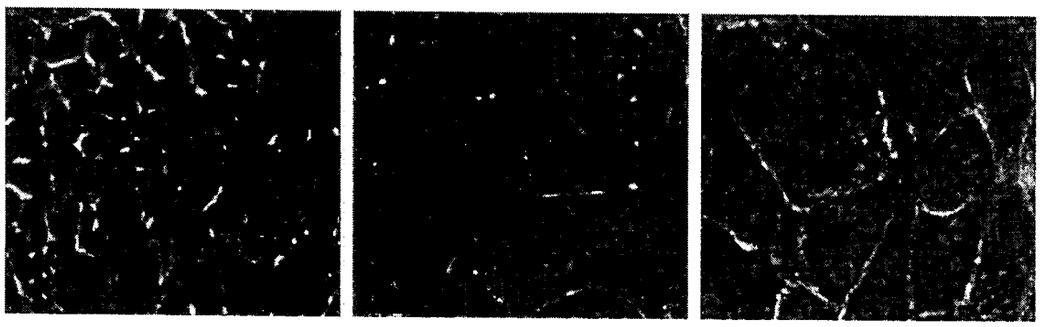


FIG.10D

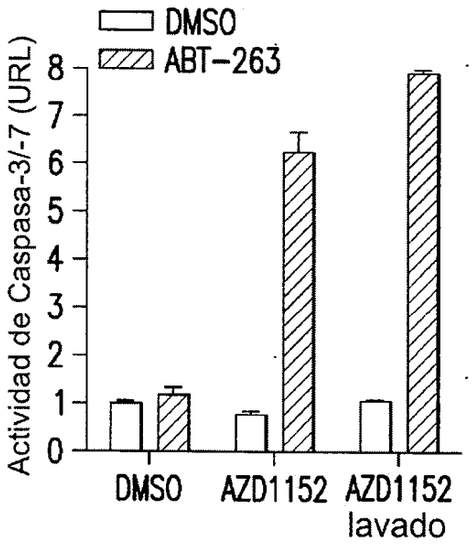


FIG.10E

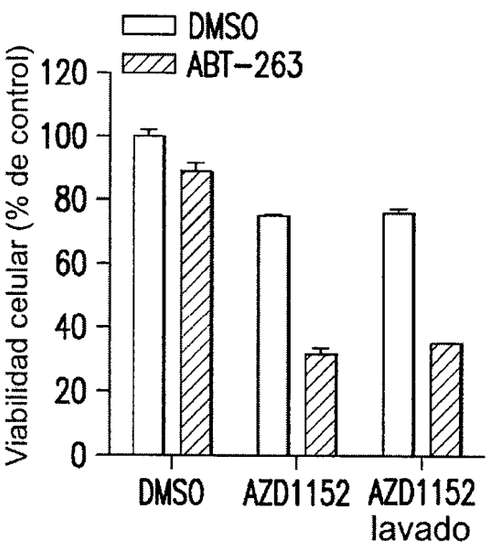


FIG.10F

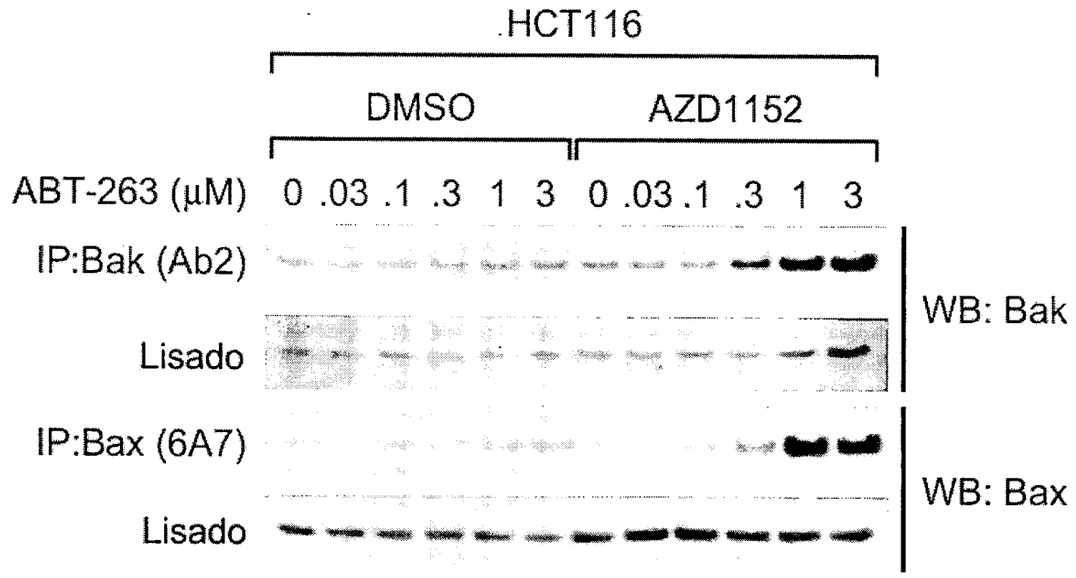


FIG. 11A

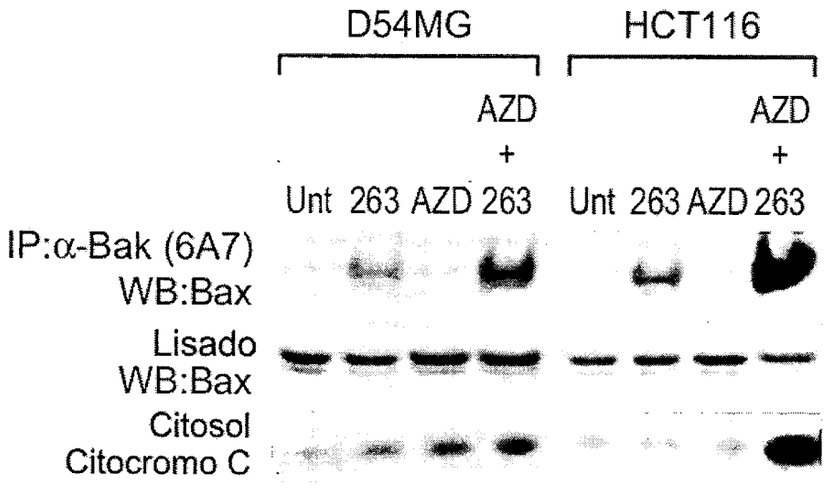


FIG. 11B

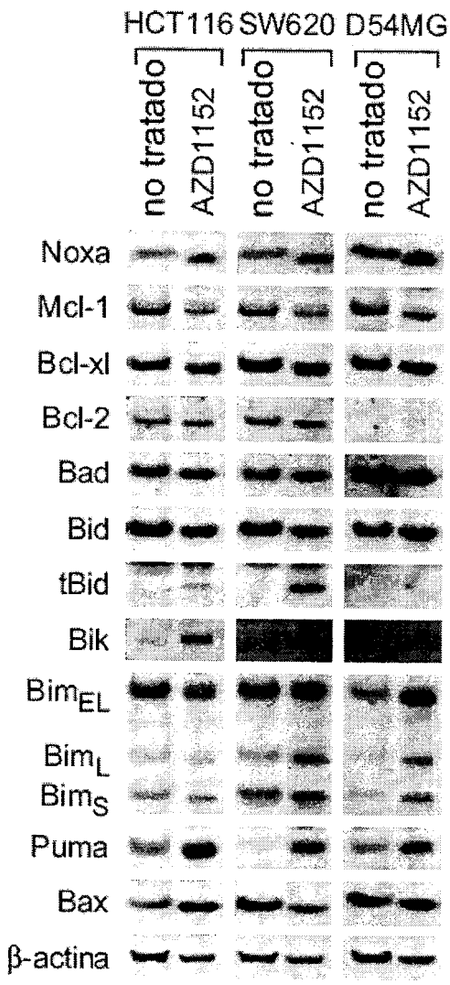


FIG.11C

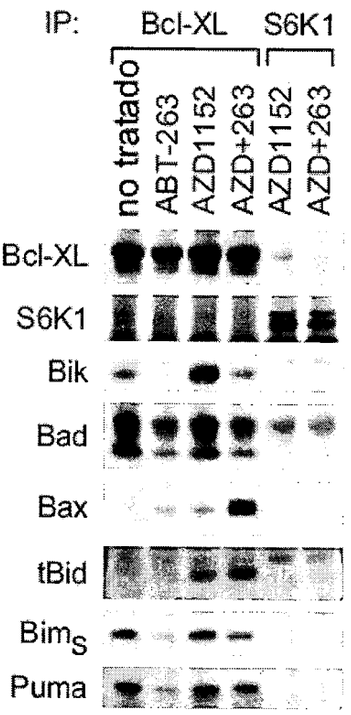


FIG.11D

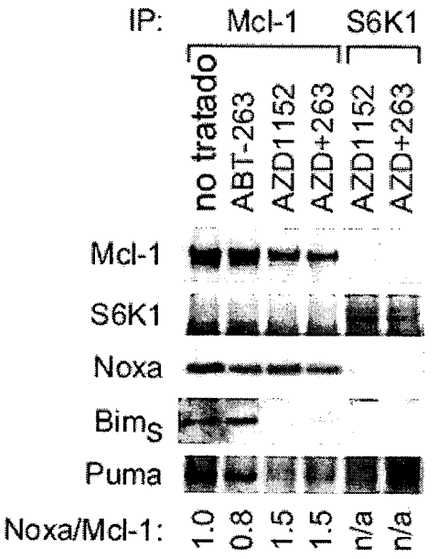


FIG.11E

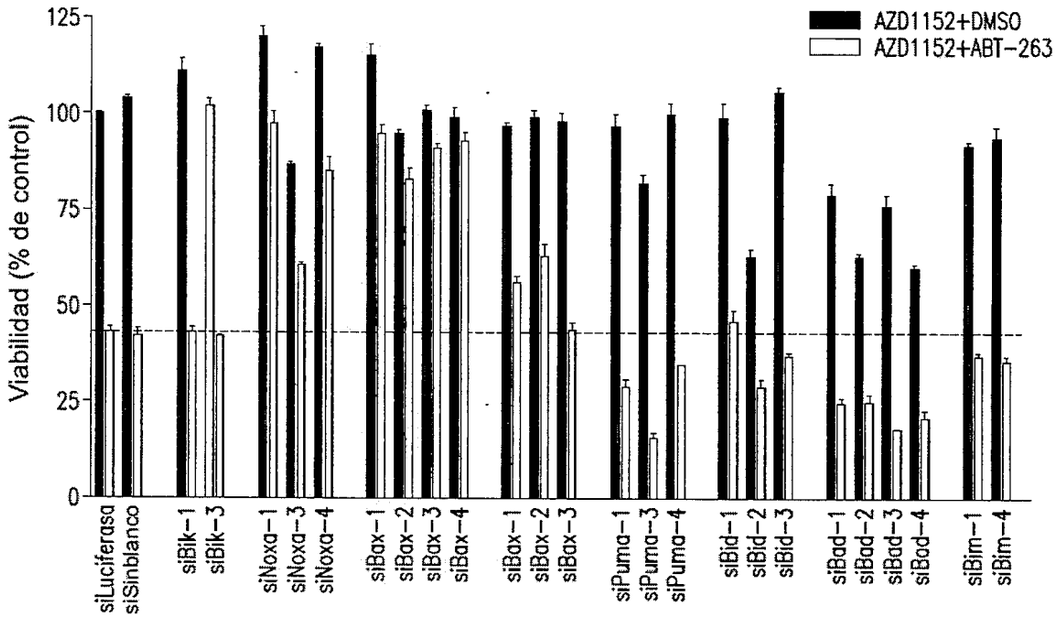

AZD1152+DMSO
AZD1152+ABT-263
Viabilidad (% de control)
125
100
75
50
25
0
siLuciferasa
siSinblanco
siBik-1
siBik-3
siNoxa-1
siNoxa-3
siNoxa-4
siBax-1
siBax-2
siBax-3
siBax-4
siBax-1
siBax-2
siBax-3
siPuma-1
siPuma-3
siPuma-4
siBid-1
siBid-2
siBid-3
siBad-1
siBad-2
siBad-3
siBad-4
siBim-1
siBim-4

FIG.12A

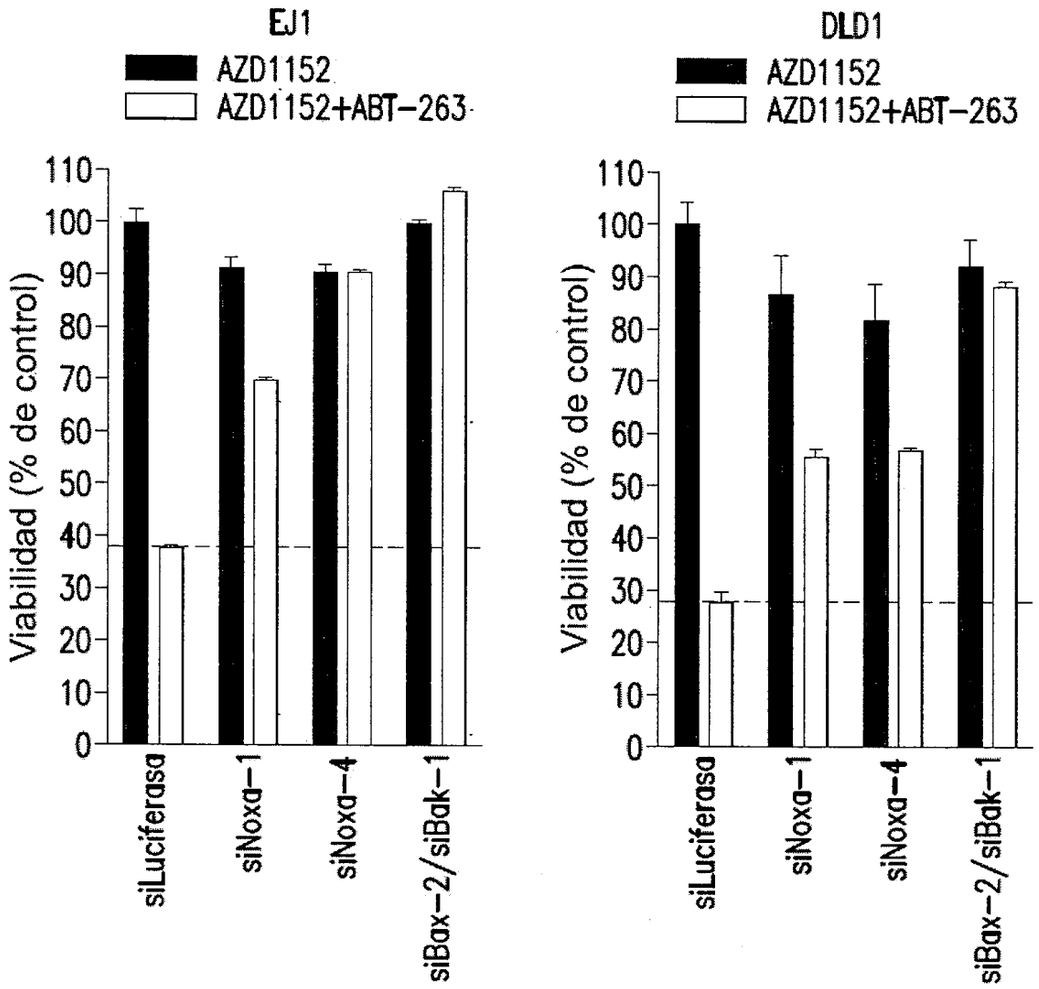

EJ1
AZD1152
AZD1152+ABT-263
Viabilidad (% de control)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
siLuciferasa
siNoxa-1
siNoxa-4
siBax-2/siBak-1
DLD1
AZD1152
AZD1152+ABT-263
Viabilidad (% de control)
siLuciferasa
siNoxa-1
siNoxa-4
siBax-2/siBak-1

FIG.12B

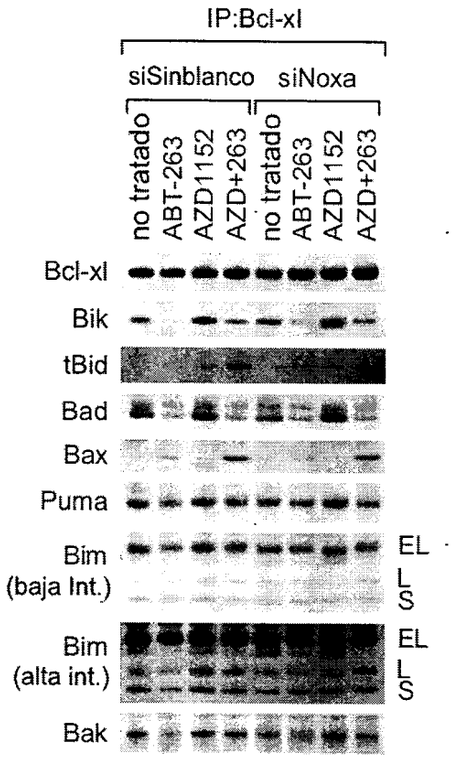


FIG.12C

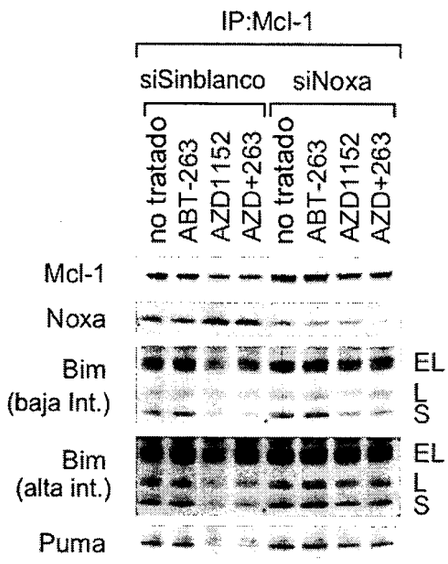


FIG.12D

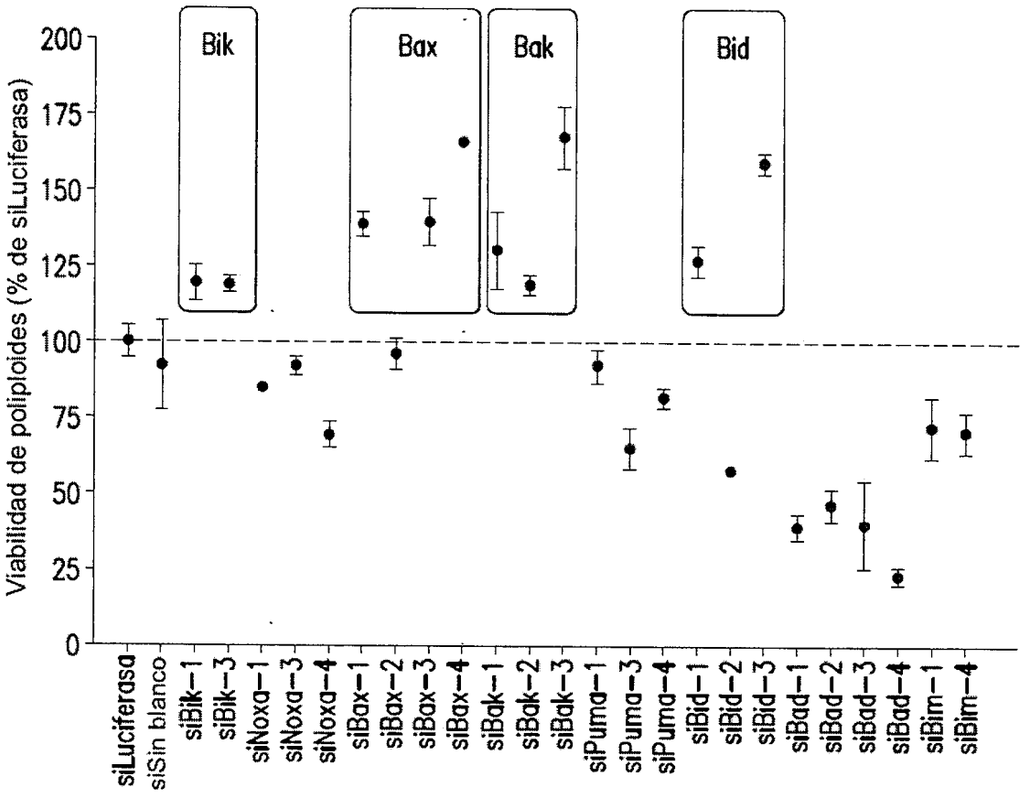

Bik
Bax
Bak
Bid
Viabilidad de poliploides (% de siLuciferasa)
200
175
150
125
100
75
50
25
0
siLuciferasa
siSin blanco
siBik-1
siBik-3
siNoxa-1
siNoxa-3
siNoxa-4
siBax-1
siBax-2
siBax-3
siBax-4
siBak-1
siBak-2
siBak-3
siPuma-1
siPuma-3
siPuma-4
siBid-1
siBid-2
siBid-3
siBad-1
siBad-2
siBad-3
siBad-4
siBim-1
siBim-4

FIG.12E

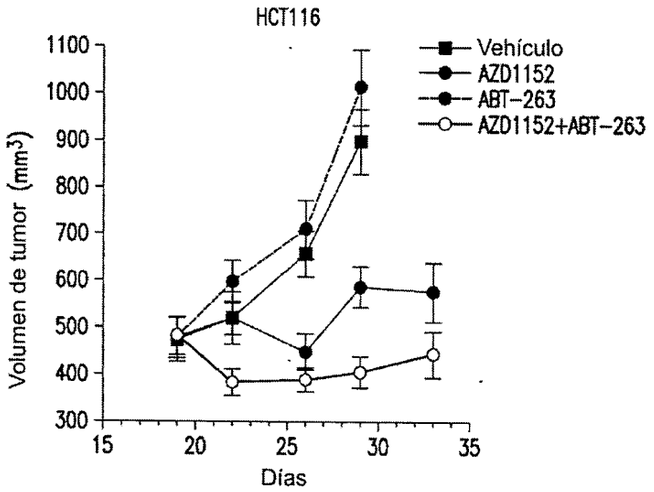


FIG.13A

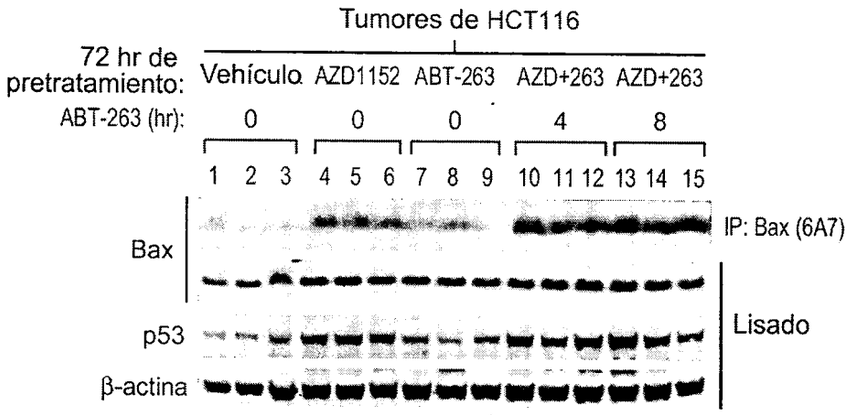


FIG.13B

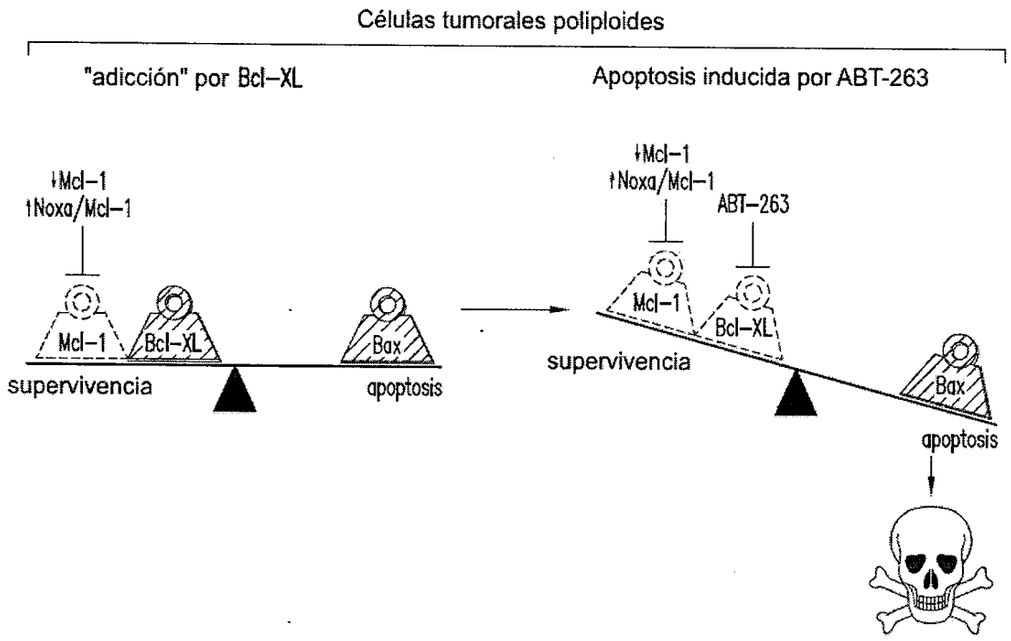

Células tumorales poliploides
"adicción" por Bcl–XL
Apoptosis inducida por ABT-263
↓Mcl–1
↑Noxa/Mcl–1
Mcl–1
Bcl–XL
Bax
supervivencia
apoptosis
↓Mcl–1
↑Noxa/Mcl–1
ABT–263
Mcl–1
Bcl–XL
supervivencia
Bax
apoptosis

FIG.13C

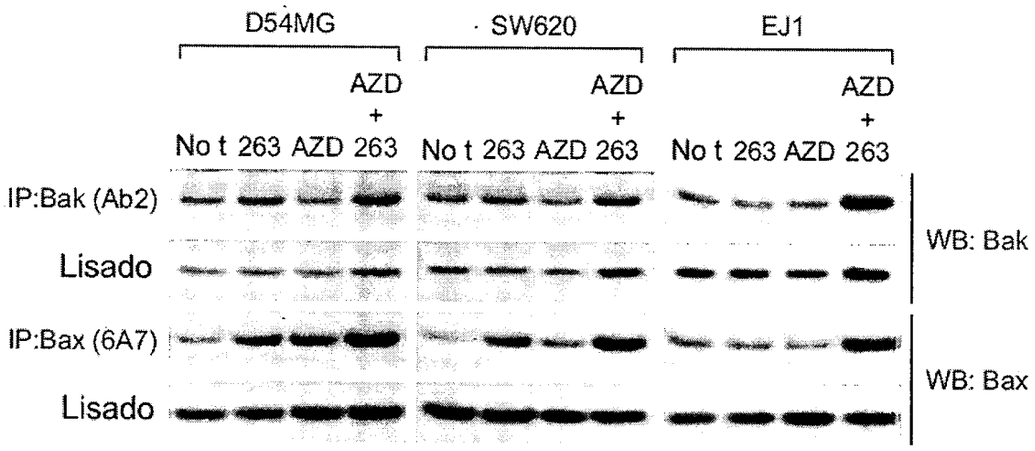

D54MG
SW620
EJ1
AZD + 263
No t
263
AZD
AZD + 263
IP:Bak (Ab2)
Lisado
IP:Bax (6A7)
Lisado
WB: Bak
WB: Bax

FIG.14

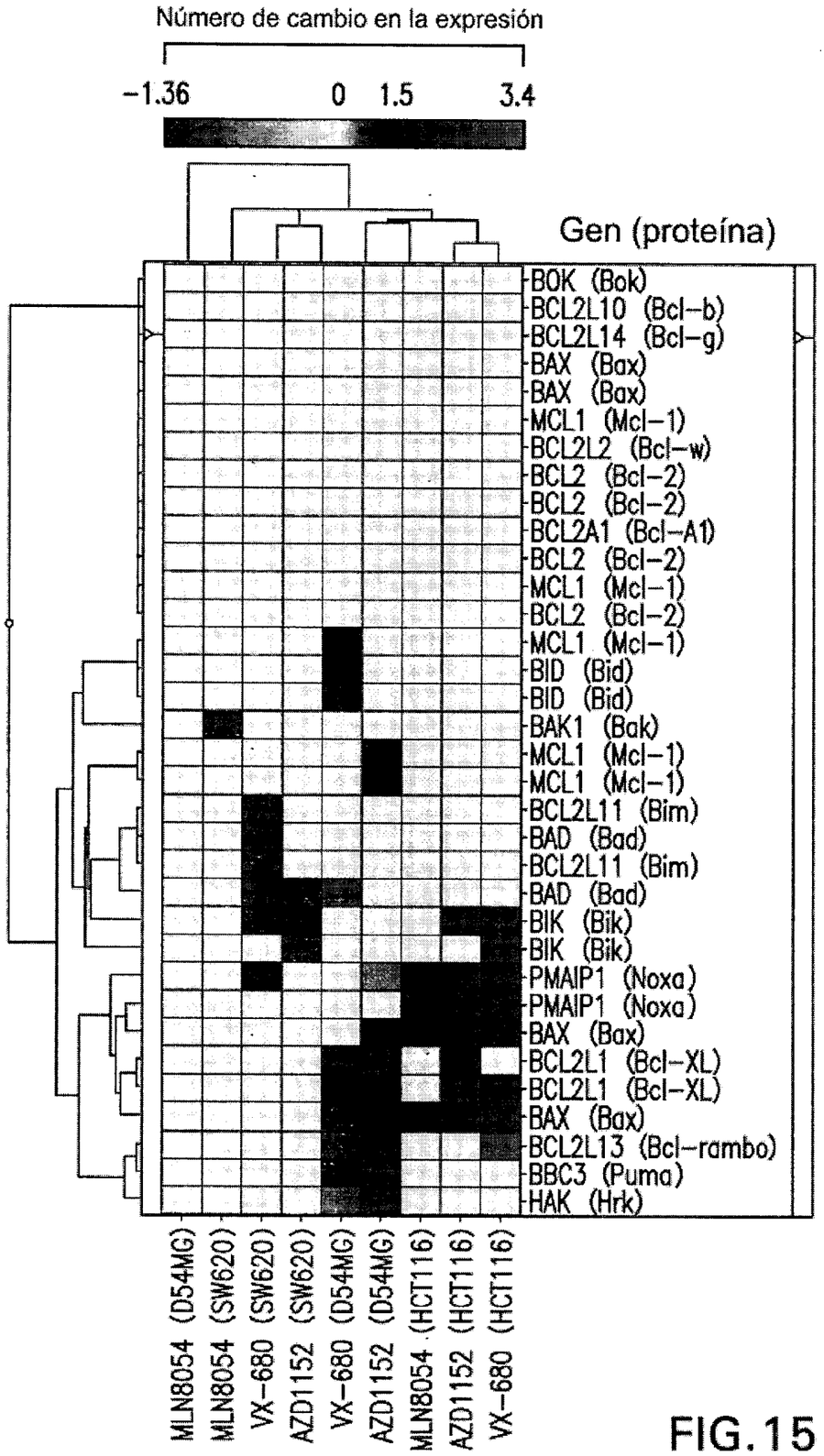

Número de cambio en la expresión
-1.36
0
1.5
3.4
Gen (proteína)
BOK (Bok)
BCL2L10 (Bcl-b)
BCL2L14 (Bcl-g)
BAX (Bax)
BAX (Bax)
MCL1 (Mcl-1)
BCL2L2 (Bcl-w)
BCL2 (Bcl-2)
BCL2 (Bcl-2)
BCL2A1 (Bcl-A1)
BCL2 (Bcl-2)
MCL1 (Mcl-1)
BCL2 (Bcl-2)
MCL1 (Mcl-1)
BID (Bid)
BID (Bid)
BAK1 (Bak)
MCL1 (Mcl-1)
MCL1 (Mcl-1)
BCL2L11 (Bim)
BAD (Bad)
BCL2L11 (Bim)
BAD (Bad)
BIK (Bik)
BIK (Bik)
PMAIP1 (Noxa)
PMAIP1 (Noxa)
BAX (Bax)
BCL2L1 (Bcl-XL)
BCL2L1 (Bcl-XL)
BAX (Bax)
BCL2L13 (Bcl-rambo)
BBC3 (Puma)
HAK (Hrk)
MLN8054 (D54MG)
MLN8054 (SW620)
VX-680 (SW620)
AZD1152 (SW620)
VX-680 (D54MG)
AZD1152 (D54MG)
MLN8054 (HCT116)
AZD1152 (HCT116)
VX-680 (HCT116)

FIG.15

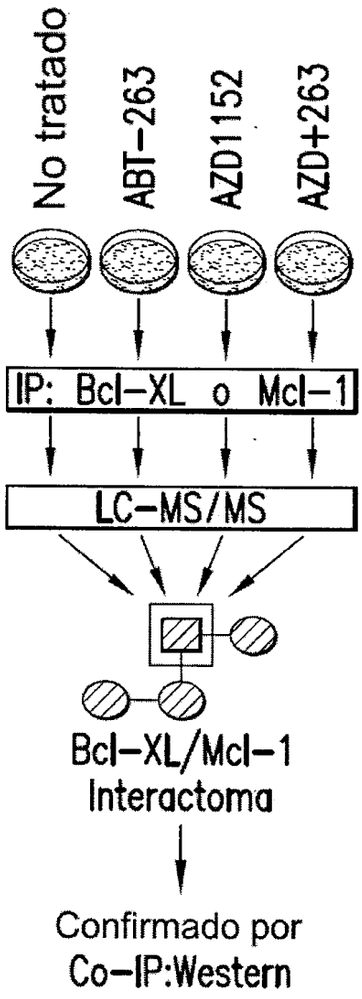

No tratado
ABT-263
AZD1152
AZD+263
IP: Bcl-XL o Mcl-1
LC-MS/MS
Bcl-XL/Mcl-1
Interactoma
Confirmado por
Co-IP:Western

FIG.16A

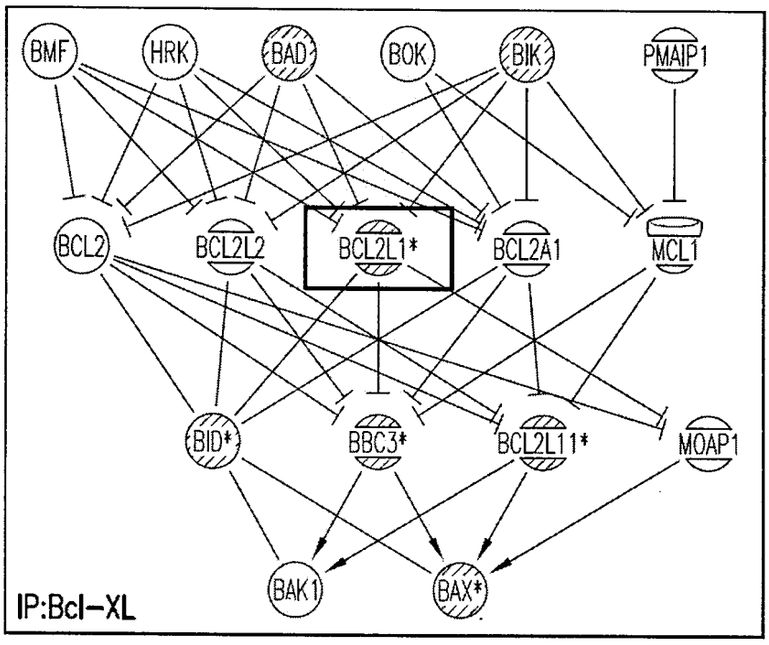


FIG.16B

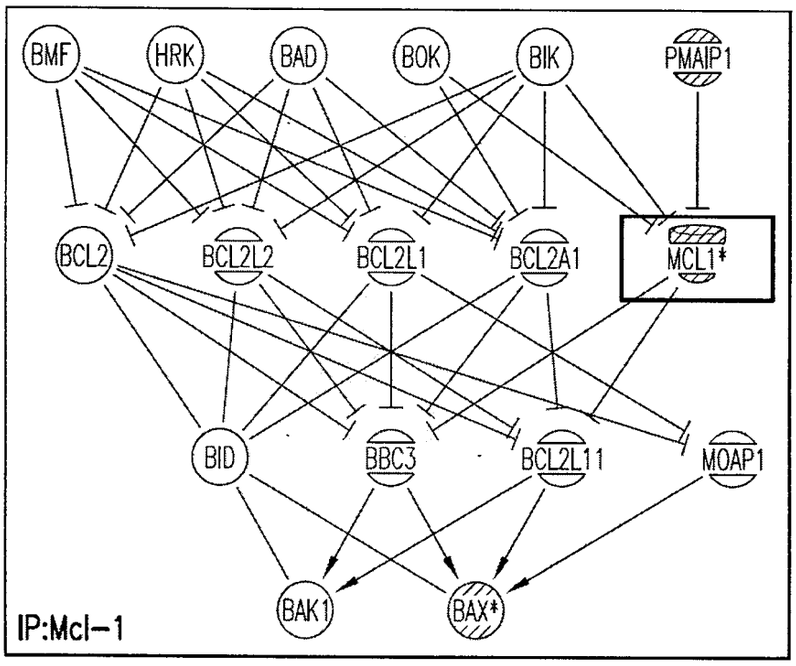


FIG.16C

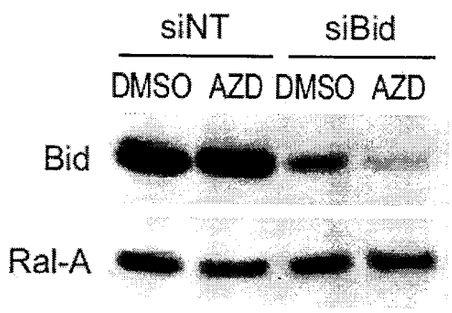


FIG.17A

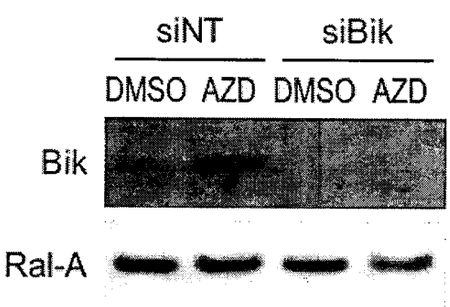


FIG.17B

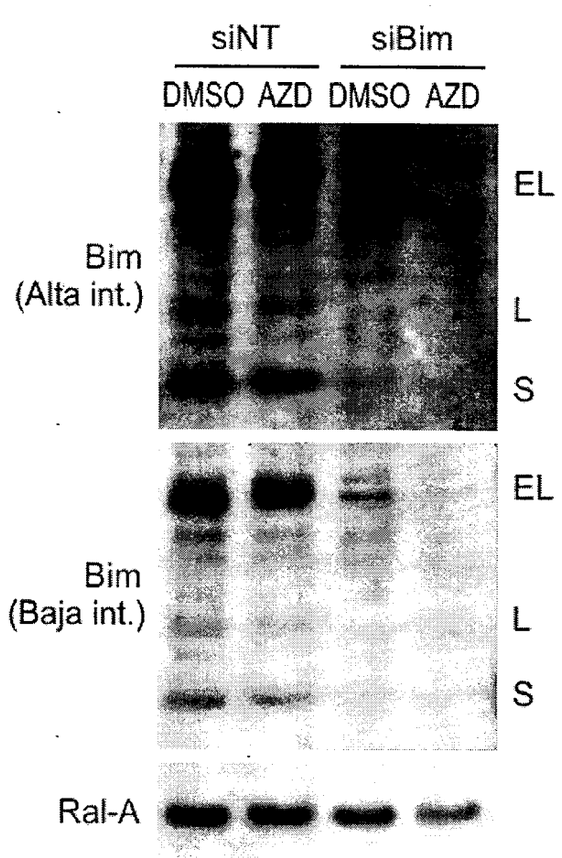


FIG.17C

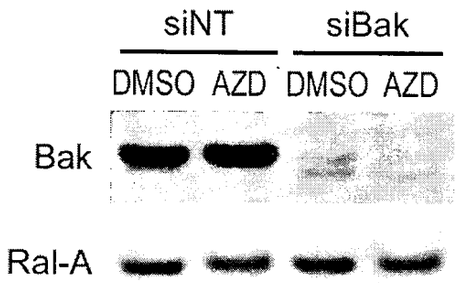


FIG.17D

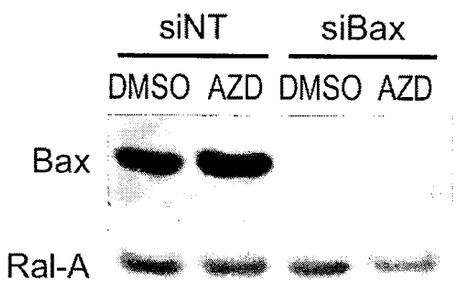


FIG.17E



FIG.17F

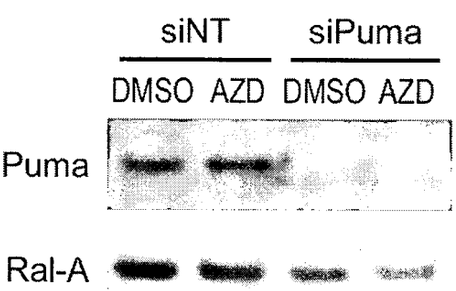


FIG.17G

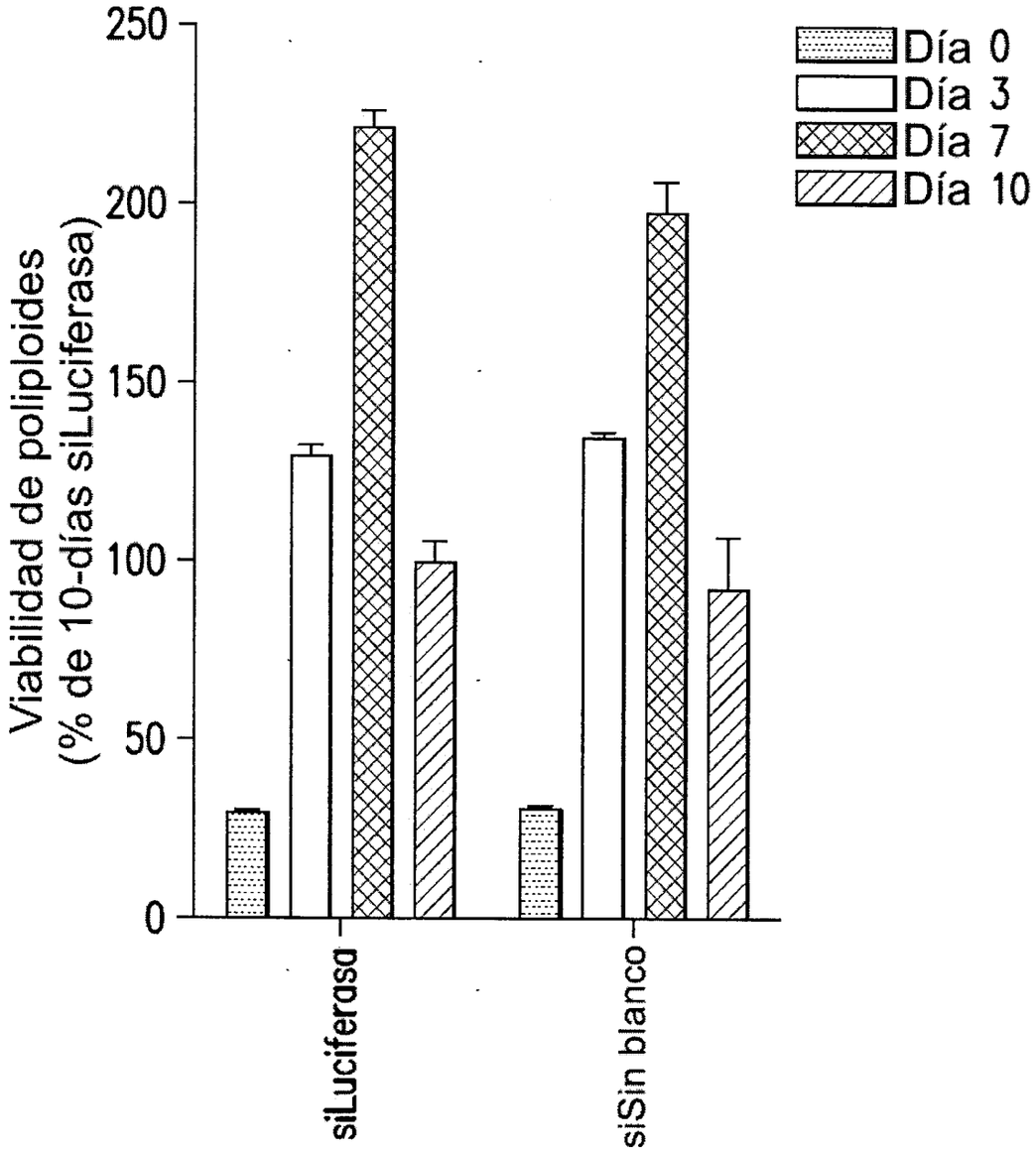

Viabilidad de poliploides
(% de 10-días siLuciferasa)
250
200
150
100
50
0
Día 0
Día 3
Día 7
Día 10
siLuciferasa
siSin blanco

FIG.18

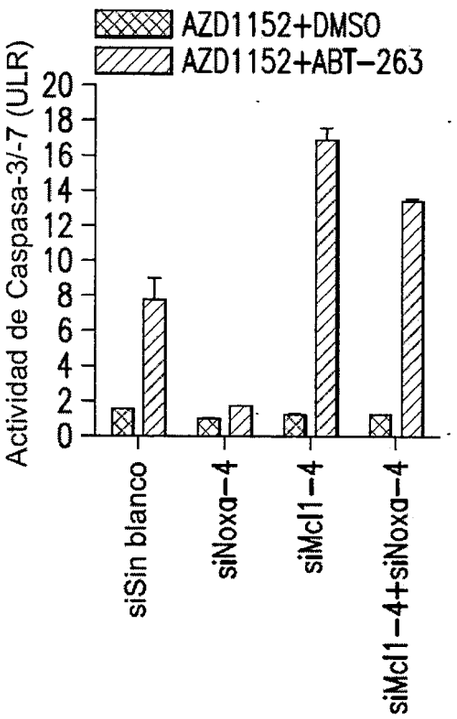


FIG.19A

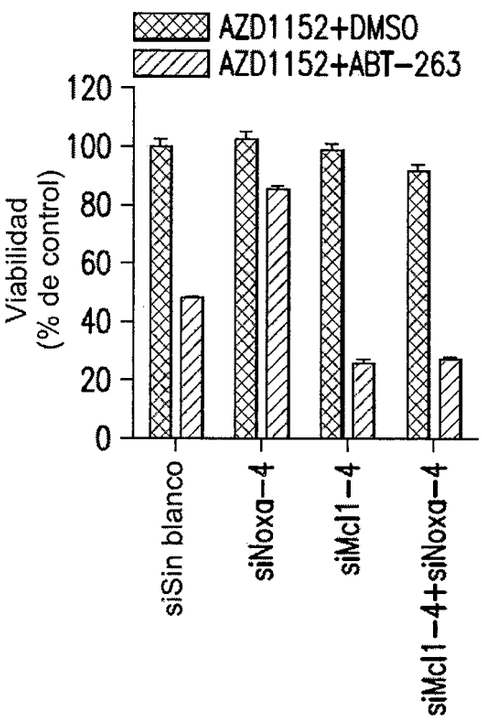


FIG.19B

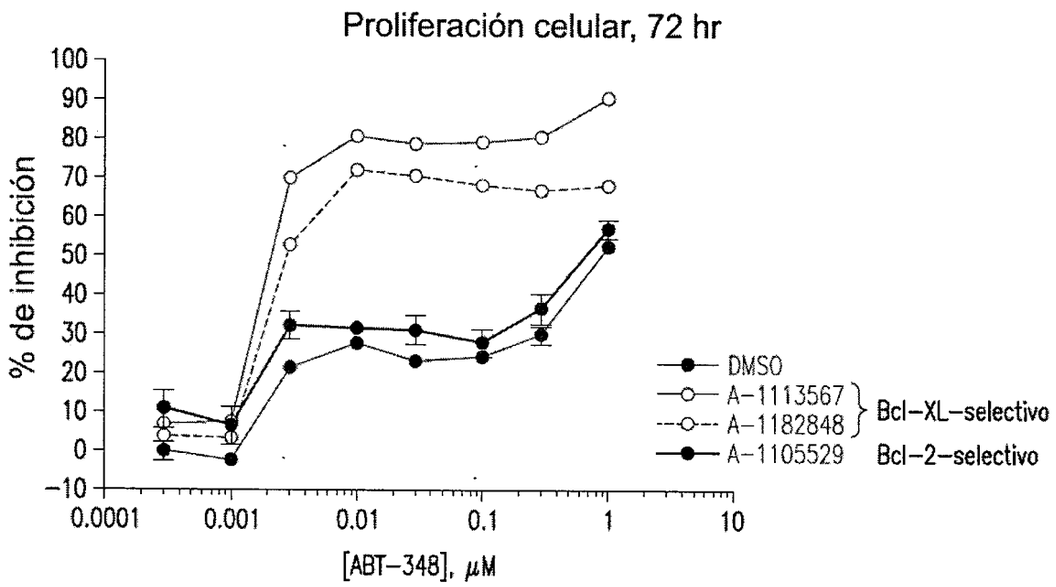

Proliferación celular, 72 hr
% de inhibición
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
−10
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
[ABT−348], μM
DMSO
A−1113567
A−1182848
Bcl−XL−selectivo
A−1105529
Bcl−2−selectivo

FIG.20

000127

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT __X__ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) Nº de solicitud: (22) Fecha de solicitud:
(51) Clasificación Internacional :

(71)Solicitante(s) **ABBOTT LABORATORIES**

(72) Inventor(es) **SHAH, Omar Jameel; SHEN, Yu; LIN Xiaoya; ANDERSON, Mark; HUANG, Xiaoli; LI, Junling; LI, Leiming**

(74) Apoderado: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	32)	Fecha	(33)	País
		12/630.957		04/12/2009		US

(85) Fecha inicio fase nacional:
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: **01/12/2010**
No. de solicitud **PCT/US2010/058549**

(87) Publicación internacional
Fecha: **09/06/2011**
Nº publicación: **WO 2011/068863 A1**

(54) Titulo: **TERAPIA COMBINADA PARA EL TRATAMIENTO DEL CANCER Y ENSAYOS DE DIAGNOSTICO RELACIONADOS**

000123

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN** ___ **Patente de Invención** ___ **Patente modelo de utilidad** _X_ **PCT**

(21) No. De solicitud	(51) int. Cl:
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) **ABBOTT LABORATORIES**
(30) Prioridad (31) No. Prioridad **12/630.957** (32) Fecha **04/12/2009** (33) País **US**	(72) Interventor (es) **SHAH, Omar Jameel** **SHEN, Yu** **LIN, Xiaoya** **ANDERSON, Mark** **HUANG, Xiaoli** **LI, Junling** **LI, Leiming**
	(74) Apoderado (s) **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**
(54) Título **TERAPIA COMBINADA PARA EL TRATAMIENTO DEL CANCER Y ENSAYOS DE DIAGNOSTICO RELACIONADOS**	
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT	
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud **01/12/2010** No. de solicitud **PCT/US2010/058549**	(87) Publicación internacional Fecha **09/06/2011** No. Publicación **WO 2011/068863 A1**

Resumen reivindicación (es):

1. Un método para tratar un paciente que sufre de cáncer, CARACTERIZADO PORQUE el método comprende los pasos de:

a) administrar a un paciente que sufre de cáncer una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente inductor de poliploidía; y

b) administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2.

2. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el al menos un agente inductor de poliploidía es un inhibidor de aurora quinasa.

3. El método de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa B.

4. El método de la reivindicación 3, en donde el inhibidor de aurora quinasa B es VX-680, AZD1152, ZM44739 o Hersperadina.

5. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 es ABT-263, ABT-737, un inhibidor selectivo para Bcl-XL o combinaciones de los mismos.

6. Una combinación de agentes terapéuticos para usar en el tratamiento de un paciente que sufre de cáncer, CARACTERIZADA PORQUE dicha combinación comprende:

a) al menos un agente inductor de poliploidía para usar para inducir poliploidización en una o más células cancerígenas en el paciente; y

b) al menos un inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2.

7. La combinación de la reivindicación 6, CARACTERIZADA PORQUE el al menos un agente inductor de poliploidía es un inhibidor de aurora quinasa.

8. La combinación de la reivindicación 7, CARACTERIZADA PORQUE el inhibidor de aurora quinasa es un inhibidor de aurora quinasa B.

9. La combinación de la reivindicación 8, CARACTERIZADA PORQUE el inhibidor de aurora quinasa B es VX-680, AZD1152, ZM44739 o Hersperadina.

10. La combinación de la reivindicación 6, CARACTERIZADA PORQUE el inhibidor de proteína de la familia de Bcl-2 es ABT-263, ABT-737, un inhibidor selectivo para Bcl-XL o combinaciones de los mismos.

...

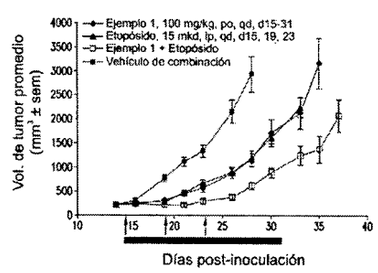


FIG.1

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-111691- -00000-0000
Fecha: 2012-07-04 14:43:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 428

PATENTE DE INVENCIÓN _____ **MODELO DE UTILIDAD** _____ **Art 33 Decisión 486/00**

Indicación que se solicita una patente.
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Descripción de la invención
Dibujos de ser estos pertinentes
Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa _____ Incompleta _____

PATENTE DE INVENCIÓN PCT X **MODELO DE UTILIDAD PCT** ___ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

X Indicación que se solicita una PCT
X Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
X Dibujos de ser estos pertinentes
X Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa X Incompleta _____

DISEÑO INDUSTRIAL _____ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

Indicación que se solicita Diseño industrial
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa _____ Incompleta _____

ESQUEMA DE TRAZADO _____ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa _____ Incompleta _____