



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 812**

51 Int. Cl.:  
**C07D 413/12** (2006.01)  
**A61K 31/42** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08749348 .2**  
96 Fecha de presentación : **06.05.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2144904**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.01.2010**

54 Título: **Óxido nítrico del ácido (S,R)-3-fenil-4,5-dihidro-5-isoxazolacético y uso del mismo como agente anti-viral y anticancerígeno.**

30 Prioridad: **09.05.2007 US 924321 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.07.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.07.2011**

73 Titular/es: **GANIAL IMMUNOTHERAPEUTICS Inc.**  
**The Corporation Trust Center**  
**1209 Orange Street**  
**Wilmington, Delaware 19801, US**

72 Inventor/es: **Nicoletti, Ferninando;**  
**Al-Abed, Yousef y**  
**Garotta, Gianni**

74 Agente: **Lazcano Gainza, Jesús**

ES 2 362 812 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Óxido nítrico del ácido (S,R)-3-fenil-4,5-dihidro-5-isoxazolacético y uso del mismo como agente antiviral y anticancerígeno

5

**Antecedentes de la invención**

El óxido nítrico (NO) es una molécula altamente reactiva implicada en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. El papel del NO en la vasodilatación, neurotransmisión e inmunidad es complejo en muchos aspectos (Tarr 2006). Esta molécula se conoce también como el principal protagonista en respuestas inmunitarias antitumorales no específicas (Roshni 2003). Sin embargo, estudios recientes muestran que la interacción con células cancerosas es más compleja de lo que se creía que era antes. El NO puede inhibir, pero también promover, metástasis y expansión tumorales (Tarr 2006, Lechner 2005). El desenlace de las interacciones tumor-NO depende de la fuente de NO, el tipo de célula expuesta, la localización del NO dentro de la célula, la duración de la exposición a NO y la presencia de otras especies de radicales libres con las cuales el NO puede interactuar (Tarr 2006). En general, el NO producido por las células NK y los macrófagos del huésped media la respuesta antitumoral (Roshni 2003). Por el contrario, se atribuye el papel protumorigénico del NO al potencial intrínseco de las células tumorales para generar esta molécula y por consiguiente autorregular su propio crecimiento (Lechner 2005). El NO influye directamente en el crecimiento de células tumorales a través de la donación de electrones y la reacción con metales de transición tales como hierro, zinc y cobre y por tanto modifica la actividad del factor transcripcional y enzimática. A través de la generación de nuevos radicales, el NO media indirectamente la destrucción adicional de componentes celulares (Li 2005, Tarr 2006, Lechner 2005).

Varios agentes antitumorales activos están disponibles actualmente; sin embargo, el diseño de fármacos contra el cáncer todavía es un gran desafío para numerosos científicos. La búsqueda tiene como objetivo hallar sustancias con eficacia mejorada, efectos secundarios reducidos y vías de administración adecuadas. Un enfoque terapéutico novedoso de interés particular en la prevención y/o el tratamiento del cáncer está representado por fármacos antiinflamatorios no esteroideos donadores de NO (NO-AINE).

Los NO-AINE consisten en AINE a los que está unido de manera covalente un grupo donador de NO a través de un espaciador alifático o aromático (véase Rigas y Kashfi 2004). Aunque estos fármacos comparten algunas propiedades farmacológicas con sus compuestos originales, los datos actuales sugieren que su modificación estructural es responsable de la potencia aumentada y la toxicidad reducida (Keeble 2002).

Los NO-AINE son eficaces en la enfermedad de Alzheimer y en enfermedades cardiovasculares, reumatológicas y pulmonares (Del Soldato *et al* 1999). La combinación de la propiedad de inhibición de la ciclooxigenasa de los AINE con el potencial tumoricida del NO hace que estos fármacos sean un candidato perfecto para el tratamiento de enfermedades malignas (véase Rigas y Kashfi 2004).

Se ha demostrado que diferentes NO-AINE afectan al crecimiento de células cancerosas tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos fármacos tienen un fuerte potencial proapoptótico y antiproliferativo frente a células cancerosas de vejiga humana, colon, próstata, pulmón, pancreáticas y de lengua y líneas celulares de leucemia (Kashfi *et al* 2003, Yeh 2004, Huguenin 2005, Huguenin 2004a, Huguenin 2004b, Gao 2005, Nath 2004, Spiegel 2005). Además, NO-aspirina y NO-indometacina son eficaces frente a la cancerogénesis gastrointestinal en ratas y ratones (Bak 1998, Williams 2004, Rao). La aspirina donadora de NO previno el cáncer pancreático en un modelo de tumor de hámster (Ouyang 2006). Los mecanismos exactos responsables de la acción de estos fármacos aún no se entienden por completo, pero se cree que las posibles dianas son NF- $\kappa$ B, ciclooxigenasa y NO-sintasa inducible (Rigas *et al* 2004).

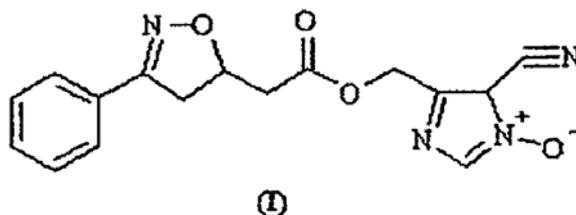
Recientemente se ha mostrado que un compuesto de isoxazolina, el ácido (S,R)-3-fenil-4,5-dihidro-5-isoxazolacético (VGX-1027) tiene fuertes propiedades inmunomoduladoras. VGX-1027 protege a los ratones frente a los efectos letales de LPS a través de la inhibición de la síntesis de TNF- $\alpha$  de los macrófagos y/o las células T (Stojanovic *et al* en impresión). Además, la administración de VGX-1027 a ratones NOD con formas aceleradas o espontáneas de diabetes o con diabetes inmunoinflamatoria inducida con múltiples dosis bajas de estreptozotocina, reduce significativamente la evolución de la diabetes (Stosic-Grujicic *et al* 2006).

El documento WO 2006/097273 da a conocer derivados del ácido 4,5-dihidro-3-fenil-5-isoxazol-acético para el tratamiento de enfermedades inmunoinflamatorias, cáncer, isquemia-reperusión, hepatitis.

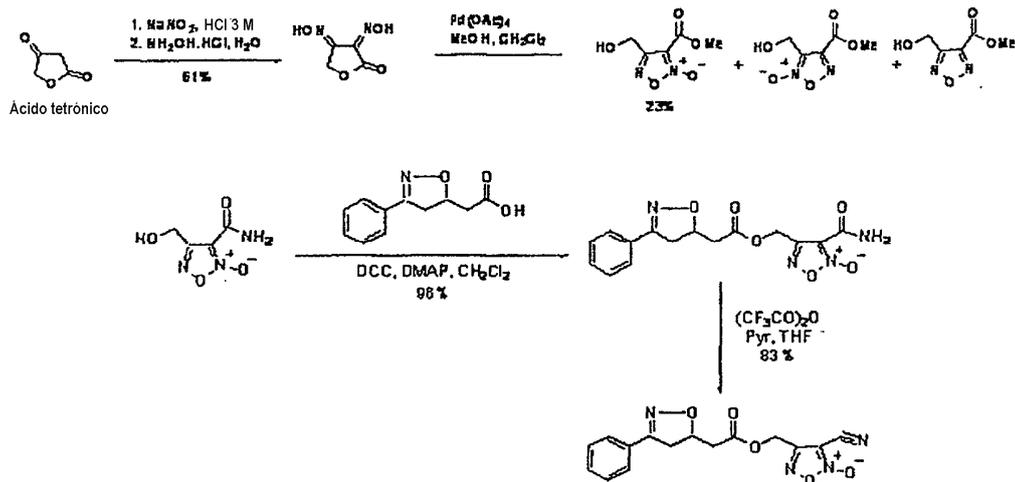
El documento WO 95/24398 da a conocer 3-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]-4,5-dihidro-N-hidroxi-5-isoxazolacetamida para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y SIDA.

**Descripción de la invención**

La presente invención se refiere a un compuesto de isoxazolina de fórmula (I)



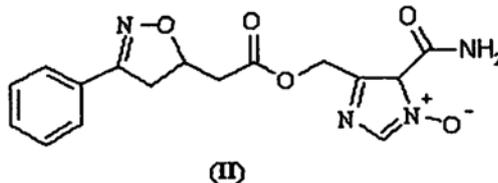
también denominado a continuación en el presente documento (GIT27-NO), que puede sintetizarse según el siguiente esquema.



- 5 El compuesto (I) demostró ser eficaz como agente antiviral y antitumoral y en la prevención y el tratamiento de úlcera gástrica en modelos de animales. Por tanto, puede usarse para la preparación de composiciones farmacéuticas antivirales y antitumorales así como para composiciones diseñadas para tratar úlceras gastrointestinales, choque hemorrágico y daño de órganos asociado con isquemia-reperfusión que pueden prepararse con excipientes y/o vehículos y según procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas, composiciones parenterales, orales y tópicas, así como colirios para el tratamiento de infecciones virales del ojo.

15 El objeto de la presente invención es también un método para el tratamiento de patologías tumorales e infecciones virales que comprende la administración de una cantidad eficaz de compuesto (II); la dosis y el momento de administración los determinará el médico según las necesidades del paciente.

La invención también se refiere al precursor del compuesto (I), el compuesto de fórmula (II)



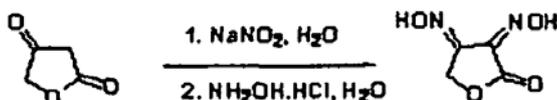
que también puede liberar NO y ha demostrado ser eficaz como agente antiviral y antitumoral.

20

La invención se ilustrará ahora en mayor detalle en la siguiente sección experimental.

## SECCIÓN EXPERIMENTAL

### 25 QUÍMICA



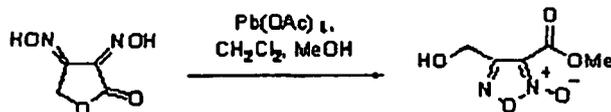
Se llevó a cabo esta reacción según el procedimiento dado a conocer en: Tetronic acids and derivatives; Part VI. A convenient synthesis of new 4-oxo-2-phenyl-2H-4,6-dihydrofuro[3,4-d]triazole and 4-oxo-4,6-dihydrofuro[3,4-c]furan systems. Parick Pollet, Suzanne Gelin. Synthesis 1979, 977-979.

30

Se añadió en porciones nitrito de sodio (6,9 g, 100 mmoles) a una disolución con agitación de ácido tetrónico (10 g, 100 mmoles) en HCl 3 M (60 ml). Se agitó la disolución de color púrpura durante 15 min. a temperatura ambiente y luego se añadió gota a gota a una disolución con agitación vigorosa de clorhidrato de hidroxilamina (13,9 g, 200 mmoles) en agua (150 ml). La coloración púrpura se desvaneció gradualmente a temperatura ambiente y precipitó

5

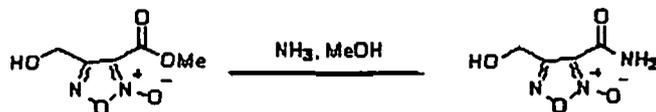
3,4-bis[hidroxilimino]-2-oxotetrahidrofuran (9,11 g, 63%) como agujas blancas.



Se llevó a cabo esta reacción según el procedimiento dado a conocer en el documento DE4401150A1.

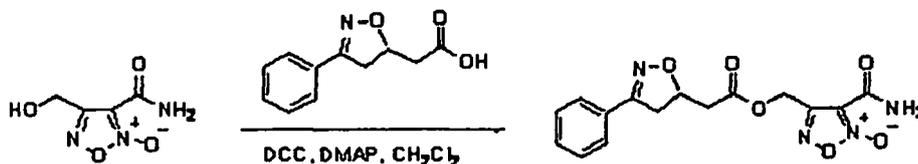
En una mezcla de 3,4-bis[hidroxilimino]-2-oxotetrahidrofuran (5,5 g, 38,2 mmoles), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 ml) y metanol (21 ml) se añadió Pb(OAc)<sub>4</sub> (16,9 g, 38,2 mmoles) a 5-10°C. Tras agitar a temperatura ambiente durante 2 h, se añadió trietilamina (5 ml, 38,2 mmoles) y se agitó durante 30 min. más. Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 ml) y se lavó con agua la mezcla. Se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> el extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se concentró a vacío. Se agitó el residuo con acetato de isopropilo y se filtró y se recristalizó el filtrado en acetato de isopropilo produciendo éster 4-hidroximetil-2-oxifurazan-3-carboximetílico (1 g, 15%). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O) δ 3,94 (3H, s), 4,85 (2H, s). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O) δ 52,6, 56,2, 107,9, 156,9, 157,8.

15



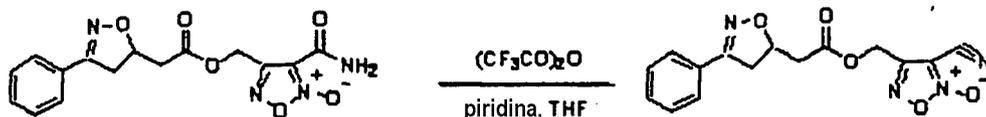
A éster 4-hidroximetil-2-oxifurazan-3-carboximetílico (611 mg, 3,51 mmoles) se le añadió amoniaco 2 M en MeOH (25 ml). Se agitó la disolución durante 2 h a temperatura ambiente. Se concentró a vacío la mezcla de reacción produciendo amida del ácido 4-hidroxi-2-oxifurazan-3-carboxílico (551 mg, 98%). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O) δ 4,80 (2H, s). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O) δ 56,1, 111,3, 157,1, 158,8.

20



A una disolución con agitación de la amida del ácido 4-hidroxi-2-oxifurazan-3-carboxílico (170 mg, 1,07 mmoles), ácido (3-fenil-4,5-dihidro-isoxazol-5-il)-acético (262 mg, 1,28 mmoles) y DMAP (65 mg, 0,53 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml), se le añadió DCC (264 mg, 1,28 mmoles). Tras agitar a temperatura ambiente durante 24 h, se añadió diel éter (50 ml) y se filtró la mezcla a través de Celite. La concentración del filtrado seguida por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc:hexano 4:1) del residuo produjo el éster deseado (356 mg, 96%). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O) δ 2,78 (d, J= 5 Hz, 1H), 2,91 (d, J= 5 Hz, 1 H) 3,30 (d, J= 8 Hz, 1 H), 3,62 (d, J= 8 Hz, 1 H), 5,14 (m, 1H), 5,48 (s, 2H), 7,42 (m, 3H), 7,68 (d, J=8Hz, 2H). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O) δ 39,2, 39,4, 57,1, 77,5, 110,7, 126,6, 128,7, 130,0, 154,9, 155,8, 156,5, 169,3.

25



30

Se añadió gota a gota anhídrido trifluoroacético (0,3 ml, 2,02 mmoles) a una disolución con agitación y enfriada con hielo-sal del éster 4-carbamoil-5-oxifurazan-3-ilmetílico del ácido (3-fenil-4,5-dihidro-isoxazol-5-il)-acético (348 mg, 1,01 mmoles) y piridina seca (0,15 ml, 2,02 mmoles) en THF (10 ml). Se retiró el baño de enfriamiento, y se continuó con la agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se acidificó con HCl<sub>(ac)</sub> al 10% y se extrajo con EtOAc. Se secaron las fases orgánicas combinadas con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporaron produciendo un residuo que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida para obtener el nitrilo deseado (275 mg, 83%). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,79 (d, J= 5 Hz, 1H), 2,93 (d, J= 5 Hz, 1 H), 3,12 (d, J= 8 Hz, 1 H), 3,55 (d, J= 8 Hz, 1H), 5,11 (m, 1 H), 5,29 (s, 2H), 7,38 (m, 3H), 7,59 (d, J= 8 Hz, 2H). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 39,2, 40,2, 56,2, 76,2, 96,5, 105,2, 126,8, 128,9, 130,6, 152,5, 156,8, 169,2.

35

40

## FARMACOLOGÍA

Se estudió el efecto antitumoral tanto del compuesto original como del compuesto conjugado con NO (I) *in vitro* sobre las líneas celulares de fibrosarcoma murino L929, melanoma murino B16 y astrocitoma de rata C6, así como en un modelo *in vivo* de melanoma en ratones C57BL/6.

### Materiales y métodos

Reactivos, células y animales

Se obtuvo naranja de acridina de Labo-Moderna, Francia. El éster succidinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) procedía de Molecular Probes (Eugene, EE.UU.). Bis-tirfostina procedía de ICN Biomedicals (Irvine, CA). Todos los demás productos químicos utilizados en los experimentos se adquirieron de Sigma (St. Louis, EE.UU.). GIT27-NO se almacenó a + 4°C a una concentración de 5 µg/ml en DMSO al 2,5% en H<sub>2</sub>O y se diluyó con el medio de cultivo inmediatamente antes de su uso. Los cultivos de células control contenían la misma cantidad de DMSO que la disolución con la mayor concentración de GIT27-NO usada en el experimento.

La línea celular de glioma de rata C6 fue un amable obsequio del Dr. Pedro Tranque (Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, España), la línea celular de melanoma murino B16 fue un amable obsequio del Dr. Sinisa Radulovic (Instituto de Oncología y Radiología de Serbia, Belgrado, Serbia) mientras que el fibrosarcoma murino L929 se obtuvo de la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (Salisbury, R.U.). Se hicieron crecer las células en medio RPMI 1640 tamponado con HEPES complementado con un 5% de FCS, glutamina 2 mM, un 0,01% de piruvato de sodio, 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M y antibióticos (medio de cultivo) a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO. Tras tripsinización convencional, se sembraron las células a una concentración de  $10^4$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos, de  $2 \times 10^5$  células/pocillo en una placa de 6 pocillos o a  $3 \times 10^4$  células/pocillo en un portaobjetos con cámara de 4 pocillos, se cultivaron durante la noche, y luego se expusieron al compuesto de prueba.

Los ratones C57BL/6 consanguíneos procedían de las propias instalaciones en el Instituto para la Investigación Biológica "Sinisa Stankovic" (Belgrado, Serbia) y se mantuvieron en condiciones de laboratorio convencionales (libres de patógenos no específicos) con libre acceso a alimentos y agua. La manipulación de los animales y el protocolo del estudio fueron según directrices internacionales y aprobadas por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales local.

### Tinción con MTT, VC y CFSE

Se sembraron las células en placas de 96 pocillos de fondo plano ( $10^4$  células/pocillo) en un volumen final de 200 µl de medio de cultivo, se incubaron durante la noche, luego se trataron con diferentes concentraciones del compuesto de prueba. Tras una incubación durante 24 h, se valoró la viabilidad celular usando la prueba del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), basada en la reducción dependiente de mitocondrias de MTT para dar formazán, o mediante tinción con violeta cristal (VC) de las células adherentes, tal como se describió previamente (Mijatovic *et al* CMLS 2004). Los resultados se presentan como % de los valores control obtenidos en cultivos no tratados. También se determinó la tasa de proliferación celular usando un análisis de citometría de flujo de células marcadas con CFSE (Kang 2005). Se desprendieron las células, se les añadió CFSE 1,5 µM y se permitió que estuvieran en reposo durante 15 min. a 37°C, luego se lavaron dos veces y se sembraron en placas de 6 pocillos a  $2 \times 10^5$ . Se trataron las células con el compuesto durante 24 y 48 h, se tripsinizaron y se lavaron dos veces. Finalmente, se resuspendieron las células en PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. Se midió la emisión de fluorescencia verde de células iluminadas con luz de excitación de 488 nm con un aparato FACS Calibur (BD, Heidelberg, Alemania) y se analizaron usando el software CellQuest.

### Determinación de muerte celular

Como marcador de la muerte celular necrótica, se midió la liberación de la enzima intracelular LDH, que media la conversión de 2,4-dinitrofenilhidrazina en un precipitado visible de hidrazona en presencia de piruvato. Se sembraron las células en placas de 96 pocillos de fondo plano tal como se indicó anteriormente y se realizó el ensayo tras una incubación durante 24 h, tal como se describió anteriormente (Decker *et al*). Se determinó el porcentaje de células muertas usando la siguiente fórmula:  $[(E - C)/(T - C)] \times 100$ , en la que E es la absorbancia experimental de los cultivos tratados medida a 492 nm, C es la absorbancia de los sobrenadantes de células no tratadas control, y T es la absorbancia correspondiente a la liberación máxima (100%) de LDH de células lisadas con Triton. Se llevaron a cabo el análisis del ciclo celular y la detección de apoptosis exactamente tal como se describe en la bibliografía (Mijatovic CMLS 2005). Se tiñeron orgánulos vesiculares ácidos, que caracterizan la autofagia, mediante el colorante vital naranja de acridina. La intensidad de la fluorescencia roja es proporcional a la acidez y el volumen de los orgánulos, mientras que el citoplasma y el nucleolo emiten verde brillante y rojo tenue (Kanzawa 2004). Para la detección de autofagia, se cultivaron las células en placas de 6 pocillos tal como se describió anteriormente, se desprendieron y se tiñeron con naranja de acridina 1 µg/ml durante 15 min. a T.A. Al final del periodo de incubación, se lavaron las células y finalmente se resuspendieron en PBS. Se midió la emisión de

fluorescencia verde (510-530 nm) y roja (>650 nm) de  $10^4$  células iluminadas con luz de excitación azul (488 nm) con un aparato FACSCalibur y se analizaron usando el software CellQuest.

#### Medición de la acumulación de nitritos y ERO

Se tiñeron las células que se hicieron crecer en la placa de 6 pocillos con dihidrorrodamina 123  $1 \mu\text{M}$  (DHR) 20 min. antes del tratamiento con el compuesto de prueba. Al final del periodo de cultivo, se desprendieron las células, se lavaron y se resuspendieron en PBS. Se realizó el análisis de la liberación de ERO con un aparato FACSCalibur y se analizó usando el software CellQuest Pro (Kaludjerovic 2005).

Se midió la acumulación de nitritos mediante la reacción de Griess tal como se describió anteriormente (Mijatovic *et al* CMLS 2004).

#### ELISA basado en células

Se determinó la activación de MAP cinasas (p38 MAPK, cinasa reguladas por señales extracelulares, ERK, y cinasa Jun N-terminal, JNK) o factor- $\kappa\text{B}$  nuclear (NF- $\kappa\text{B}$ ) por medio de un método de ELISA ligeramente modificado basado en células de Versteeg *et al.* (Versteeg 2000). Puesto que las MAP cinasas se activan mediante fosforilación, y la fosforilación de la subunidad inhibidora I $\kappa\text{B}$  es una etapa necesaria para la activación de NF- $\kappa\text{B}$ , se usaron anticuerpos específicos para formas fosforiladas de MAP cinasas (p-p38, p-ERK y p-JNK) e I $\kappa\text{B}$  (p-I $\kappa\text{B}$ ). Se hicieron crecer las células durante la noche en placas de fondo plano de 96 pocillos en un medio de cultivo que contenía un 0,5% de FCS y luego se trataron con el compuesto de prueba diluido con medio de cultivo convencional. Al final del periodo de tratamiento, se fijaron las células en paraformaldehído al 4%, se extinguió la peroxidasa endógena con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 1% en PBS que contenía un 0,1% de Triton X-100 (PBST), y se bloqueó la unión inespecífica de los anticuerpos con una disolución de PBST que contenía un 10% de FCS. Se aplicaron anticuerpos monoclonales primarios de ratón específicos para p-ERK, p-p38, p-JNK, p-I $\kappa\text{B}$  (1:200; todos de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) de rata/ratón en PBST complementado con un 2% de albúmina sérica bovina (PBSTB), seguido por IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa secundaria (1:2500 en PBSTB; USB corporation, Cleveland, OH) para anticuerpos anti-p-ERK, anti-p-JNK y anti-p-I $\kappa\text{B}$ , o IgM anti-ratón (1:4000; USB corporation) para la detección de anticuerpo anti-p-p38. Se llevó a cabo la incubación con anticuerpos a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 h. Tras una incubación de 15 min. con sustrato de peroxidasa TMB y posterior adición de HCl 0,1 M, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas automático. Para permitir la comparación entre el tratamiento y el control, se corrigieron las absorbancias resultantes para el número de células determinado mediante tinción con violeta cristal, tal como se describe en el protocolo original. Los resultados se presentan como la expresión relativa en comparación con el valor control, que se fijó arbitrariamente en 1.

#### Inducción de melanoma en ratones C57BLI6 y tratamiento con GIT27-NO

Se indujeron tumores primarios mediante inyección subcutánea (s.c) de  $2 \times 10^5$  células de melanoma B16 en la región lumbosacra derecha dorsal de ratones C57BU6 singénicos. Se observó diariamente el crecimiento tumoral, y se inició el tratamiento con GIT27-NO a partir del día en que fue palpable el primer tumor (día 10). Se preparó GIT27-NO inmediatamente antes del tratamiento y se aplicó por vía i.p. a una dosis de 0,5 mg/ratón durante 14 días consecutivos. Se observaron los animales hasta el día 30, luego se sacrificaron y se determinó el crecimiento tumoral mediante mediciones tridimensionales de tumores individuales de cada ratón. Se calculó el volumen tumoral usando la siguiente fórmula:  $[0,52 \times a \times b^2]$ , en la que a es el diámetro más largo y b es el más corto (Smagur *et al*).

#### Hepatitis inducida mediante inyección de concanavalina (ConA) en ratones NMRI y tratamiento con Git27-NO

La hepatitis inducida por ConA es un estado inmunoinflamatorio mediado por células similar a diferentes estados inmunoinflamatorios de enfermedades hepáticas en seres humanos que puede inducirse en ratones mediante una única inyección intravenosa de ConA. Esta enfermedad se caracteriza por un notable aumento en los niveles plasmáticos de transaminasa poco después (8-24 horas) de la exposición a ConA y la infiltración simultánea del hígado con neutrófilos, macrófagos y células T seguido por apoptosis y necrosis de los hepatocitos.

Se indujo hepatitis mediante inyección de ConA (Sigma Chemical, St. Louis, MO) en las venas de la cola en ratones macho del Instituto Naval de Investigación Médica (NMRI) de seis a 9 semanas. Se trataron cuatro grupos de ratones o bien por vía i.p. con Git27-NO a las dosis de 0,5 y 1 o bien por vía p.o. a 5 mg/ratón o bien con el vehículo, -24 y -1 hora antes de la administración de ConA. Se sacrificaron los animales para la extracción de sangre 8 horas después de la inyección de Con A y se determinó la actividad de alanina aminotransferasa (ALT) en plasma mediante un ensayo fotométrico convencional usando un analizador bicromático.

#### Análisis estadístico

Los resultados se presentan como medias  $\pm$  D.E. de observaciones por triplicado de un representante de al menos tres experimentos con resultados similares, a menos que se indique lo contrario. Se valoró la significación de las

diferencias entonces entre diversos tratamientos mediante un análisis de la varianza (ANOVA), seguido por la prueba de Student-Newman-Keuls o la prueba de la U de Mann-Whitney para evaluar la eficacia de GIT27-NO *in vivo*. Se consideró que era significativo un valor de p inferior a 0,05.

## 5 RESULTADOS

### Evaluación de la actividad antitumoral de GIT27-NO frente a VGX-1027

Para evaluar el efecto antitumoral de VGX-1027 y GIT27-NO, se incubaron tres líneas celulares malignas, astrocitoma de rata C6, fibrosarcoma murino L929 y melanoma murino B16, durante 24 h con diferentes concentraciones de los fármacos y luego se determinó la viabilidad celular mediante las pruebas de MTT y VC. Tal como se muestra en la figura 1A, el compuesto original VGX-1027 no afectó a la viabilidad de las células tumorales. Por otro lado, el tratamiento de las tres líneas celulares con GIT27-NO en el mismo intervalo de concentración (figura 1B) provocó una reducción dependiente de la dosis de la respiración mitocondrial. Se evaluó el efecto en cuanto a la reducción del número de células estimado mediante VC (figura 1C). Por tanto, resultó evidente que la modificación química de VGX-1027 inactivo dio como resultado un nuevo compuesto con fuerte actividad tumoricida. Considerando esto, se excluyó VGX-1027 de la investigación adicional. Para evaluar la relación entre el efecto antitumoral del compuesto (I) y su capacidad para liberar NO, se comparó la acumulación de nitritos en sobrenadantes de cultivo celular con su cantidad en medios de cultivos solos. Tal como se muestra en la figura 1D, GIT27-NO no pudo liberar NO y formar nitritos en ausencia de células, mientras que se observó una cantidad significativa de nitritos tras el tratamiento de las células. Estos datos sugieren que, a diferencia de los donadores de NO exógenos convencionales, GIT27-NO no puede producir la liberación espontánea de NO. Para investigar el papel de NO en la regulación por disminución mediada por GIT27-NO de la viabilidad celular, se cultivaron células tumorales en paralelo con la hemoglobina que elimina NO. La viabilidad de las células tratadas con GIT27-NO en tales condiciones se restauró casi por completo, lo que indica la importancia de NO en la citotoxicidad mediada por fármaco (figura 1E). Este fenómeno se visualizó adicionalmente mediante microscopía óptica (figura 1F).

### GIT27-NO induce distintos tipos de muerte celular

Para determinar el efecto antiproliferativo del compuesto (I), se realizó un análisis de citometría de flujo de células teñidas con CFSE durante un cultivo de 24 h con o sin GIT27-NO. A pesar de la disminución significativa en el número de células L929 y B16 viables tras el tratamiento con GIT27-NO (figuras 1B y C), las células se dividieron casi a la misma frecuencia que las células control no tratadas (tabla 1), lo que indica que la inhibición de la proliferación no es responsable del efecto antitumoral observado. En paralelo, el tratamiento con GIT27-NO afectó a la proliferación de células C6 (tabla 1), lo que sugiere que la reducción de células viables está mediada al menos parcialmente por el efecto citostático del fármaco sobre esta línea celular. Posteriormente, se analizó la presencia de diferentes tipos de muerte celular tras el tratamiento de células con GIT27-NO. Se determinó la necrosis mediante el ensayo de liberación de LDH, basado en la permeabilidad alterada de las células que mueren. Tal como se muestra en (figuras 2A y B), el tratamiento con GIT27-NO indujo la liberación de LDH en las tres líneas celulares sometidas a prueba. La liberación de LDH fue tanto dependiente de la dosis (figura 2A) como dependiente del tiempo (figura 2B). Sin embargo, pudo detectarse una cantidad significativa de LDH tras el cultivo durante 18 h con el fármaco, pero no en puntos de tiempo anteriores, lo que sugiere que el efecto observado podía atribuirse a la fase final de la apoptosis (necrosis secundaria) más que a la muerte celular necrótica primaria. El análisis del contenido de ADN celular realizado tras el cultivo durante 24 h con el compuesto (I) reveló una proporción aumentada significativamente de células hipodiploides (compartimento subG de células teñidas con PI) en cultivos L929 (figura 2C). Por otro lado, el porcentaje de células C6 y B16 en el compartimento subG tras la incubación en presencia de GIT27-NO fue inferior (menor que el 10%) que en los cultivos L929, lo que indica la importancia de otro tipo de muerte celular en la citotoxicidad mediada por fármaco (figura 2C). Además, se observó la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 en células C6 tratadas con GIT-27NO (figura 2C). Por consiguiente, fueron visibles células con cromatina condensada y núcleo contraído en cultivos expuestos a fármaco, confirmando la prevalencia de la muerte celular apoptótica en cultivos de L929 en contraposición a las células B16 y C6 (figura 2D). Por tanto, se analizó la manera alternativa de muerte celular conocida como muerte celular autofágica en células B16 y C6 tras el tratamiento con GIT27-NO. Para identificar el desarrollo de autofagosomas ácidos típicos de la autofagia, se realizó un análisis de citometría de flujo de células teñidas con naranja de acridina. Tal como se muestra en las figuras 3A-C, en ambas líneas celulares GIT27-NO aumentó significativamente la intensidad de la fluorescencia roja brillante, lo que muestra el desarrollo de vesículas ácidas. Para examinar la relevancia de la muerte celular autofágica en la disminución de la viabilidad de las células expuestas al compuesto (I), se trataron las células en paralelo con inhibidores autofágicos conocidos, bafilomicina A (Baf) y 3-metil-adenina (3-MA). 3-MA inhibió el secuestro autofágico a través de la inhibición de PI-3 cinasa, mientras que Baf, un inhibidor de H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar, bloqueó la fusión de los autofagosomas con lisosomas (Kanzawa 2004). Tal como se evaluó mediante el ensayo de MTT, se recuperó la viabilidad de células tratadas con GIT27-NO, en presencia de ambos inhibidores autofágicos sometidos a prueba, confirmando así la contribución de la muerte celular autofágica en la citotoxicidad de GIT27-NO frente a células B16 y C6 (figura 3E). Se confirmó la viabilidad restaurada de células C6 en presencia de 3-MA mediante microscopía óptica (figura 3F). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la capacidad de inducir diferentes tipos de muerte celular en diferentes células cancerosas se basa en la especificidad intrínseca del tipo celular, más que en las propiedades de GIT27-NO.

Tabla 1. Efecto de GIT27-NO sobre la tasa de proliferación de células tumorales

CFSE <sup>a</sup>		C6	B16	L929
Control	R1 <sup>b</sup>	8,37%	2,00%	7,26%
	R2 <sup>c</sup>	87,05%	96,58%	88,57%
GIT27-NO	R1	42,53%	6,90%	13,23%
	R2	30,75%	90,65%	78,07%

<sup>a</sup>Se tiñeron las células con CFSE inmediatamente antes del tratamiento con GIT27-NO (25 µg/ml). Tras 48 h, se estimó la división celular mediante citometría de flujo.

<sup>b</sup>R1 = población original

<sup>c</sup>R2 = población dividida

### 5 La citotoxicidad de GIT27-NO depende de la generación de ERO

Se sabe que el estrés oxidativo desencadena la muerte celular. Por tanto, se investigó el papel del estrés oxidativo en la acción citotóxica observada de GIT27-NO. En comparación con células control, la producción intracelular de ERO aumentó notablemente tras el tratamiento de las células con GIT27-NO, tal como se estimó mediante fluorescencia de DHR intracelular (figuras 4A-C). La neutralización de ERO por el eliminador NAC restauró la viabilidad de las células tratadas con GIT27-NO, lo que indica que la liberación de ERO era responsable al menos parcialmente del efecto tumoricida del fármaco (figura 4D).

### 15 GIT27-NO regula de manera diferencial las rutas de MAP cinasas en las células tumorales C6, B16 y L929

Las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAP) son una familia de serina-treonina cinasas que es crítica para la conversión de señales extracelulares en importantes señales celulares incluidas en la supervivencia, proliferación y muerte (Schindler 2001, Wada 2004, Arbabi 2002). Por tanto, se analizó la influencia de GIT27-NO sobre la activación de estas rutas de señalización. Tal como se determinó mediante ELISA basado en células, diferentes moléculas de señalización son dianas en diferentes líneas celulares. En células C6, GIT27-NO indujo la activación permanente de ERK1/2 y JNK (figura 5A). Por otro lado, se observó un patrón diferente en cultivos de células B16. Mientras que GIT27-NO no afectó a la activación de ERK1/2 en células B16, se observó una activación dependiente del tiempo significativa de JNK y sólo una ligera activación de p38 (figura 5B). Finalmente, el tratamiento de L929 con GIT27-NO condujo a una activación notable y sostenida de ERK1/2 y la activación transitoria significativa de p38, sin afectar a la expresión de JNK (figura 5C). En un esfuerzo por valorar la significación biológica de la activación de MAP cinasa en la reducción de la viabilidad celular se usaron inhibidores farmacológicos conocidos de estas moléculas: PD98059 para ERK, SP600125 para JNK, y SB202190 para la activación de p38. Antes de la incubación con GIT27-NO, se pulsaron las células durante 30 min. con cada uno de estos inhibidores y se estimó la viabilidad mediante MTT tras 24 h de cultivo. El tratamiento de células C6 con inhibidores específicos de ERK y JNK (figura 5D), células B16 con inhibidor de JNK (figura 5E), y células L929 con inhibidores de ERK y p38 (figura 5F) mejoró significativamente la supervivencia de las líneas celulares tumorales, confirmando el papel de estas moléculas en la citotoxicidad mediada por fármaco. Los datos sugieren por tanto que la capacidad de GIT27-NO para desencadenar diferentes moléculas en la cascada de señalización está determinada principalmente por el tipo celular. Para examinar la influencia de moléculas de señalización aguas arriba se trataron las células con el inhibidor de proteína tirosina cinasa (PTK), tirfostina, en paralelo con GIT27-NO. Tal como se muestra en la figura 5G, la inhibición de PTK restauró casi por completo la viabilidad de todas las líneas celulares sometidas a prueba, lo que indica la misma posición de la diana de la acción farmacológica. Se visualizó el efecto de tirfostina sobre células C6 tratadas con GIT27-NO mediante microscopía óptica (figura 5H).

### 40 GIT27-NO inhibe el crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 que portan melanoma B16

Habiéndose demostrado las propiedades citotóxicas de GIT27-NO *in vitro*, se evaluaron sus propiedades antitumorales *in vivo* en ratones que portaban melanoma B16. Tal como se ilustra en la tabla 2, un tratamiento de ciclo corto con GIT27-NO (0,5 mg/ratón/día durante 10 días), iniciado en el día 10 tras la implantación del tumor cuando fue palpable el primer tumor, se asoció con una reducción significativa del crecimiento tumoral en comparación con animales control sin tratar. El efecto fue estable incluso tras la interrupción de la administración de GIT27-NO. Sólo murieron 2 animales en el grupo control, mientras que todos los animales tratados con GIT27-NO sobrevivieron 30 días del periodo de seguimiento (no mostrado). Tomadas en conjunto, las propiedades citotóxicas de GIT27-NO hacia las células de melanoma B16 se asocian con sus efectos antitumorales *in vivo*.

50

Tabla 2. Efectos del tratamiento con GIT27 *in vivo* sobre el crecimiento tumoral de melanoma B26

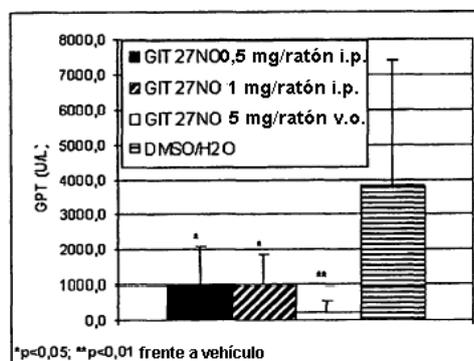
Grupo	Número de animales	Volumen tumoral medio <sup>a</sup>
Control	27	2,97±6,4
GIT27-NO	25	0,82±1,2*

<sup>a</sup>Se determinaron los volúmenes tumorales al final del periodo de seguimiento (30 días después de la implantación de células de melanoma B16) y se calcularon tal como se indicó en Materiales y métodos.

\*p<0,05, se refiere a animales control tratados sólo con vehículo.

### GIT27-NO reduce los niveles en sangre de ALT-glucosa en hepatitis inducida por ConA

5 A todas las dosis sometidas a prueba, el tratamiento profiláctico con Git27-NO redujo significativamente los niveles en sangre de ALT-glucosa en comparación con ratones tratados con vehículo.



10

## Discusión

Este estudio muestra que la modificación química de VGX-1027 permite obtener un compuesto donador de NO novedoso con fuerte potencial tumorocida. El tratamiento de tres líneas celulares diferentes, fibrosarcoma murino L929, astrocitoma de rata C6 y melanoma B16 con la sustancia modificada GIT27-NO condujo a una reducción drástica de su viabilidad. En cambio, el compuesto original VGX-1027 no afectó al crecimiento de células tumorales en el mismo intervalo de concentración o mayor (datos no mostrados) que GIT27-NO. Los efectos antitumorales de GIT27-NO no están mediados por sus efectos citostáticos sino que más bien se basan en su capacidad para desencadenar la cascada de acontecimientos intracelulares que da como resultado la inducción de la muerte celular. Sin embargo, la línea celular C6 representó una excepción, puesto que GIT27-NO provocó la detención de la división celular en la fase G0/G1. Numerosas evidencias revelaron fuertes propiedades antineoplásicas de fármacos antiinflamatorios no esteroideos modificados mediante la unión covalente de NO (Rigas 2004). Por ejemplo, se observó una reducción significativa del crecimiento de células de cáncer humano de vejiga, próstata, colon y células de leucemia Jurkat tras el tratamiento con diferentes NO-AINE (Kashfi *et al* 2003, Yeh 2004, Huguenin 2005, Huguenin 2004, Huguenin 2004, Gao 2005, Nath 2004, Spiegel 2005). Se observó que la disminución de la viabilidad de las células estuvo seguida por la liberación de LDH que se considera una característica típica de la muerte celular necrótica. Sin embargo, se observó necrosis tras una incubación de 18 h en presencia del fármaco lo que sugiere que la liberación de LDH podría atribuirse principalmente a apoptosis secundaria más que a necrosis primaria. El mecanismo más frecuente en la acción de fármacos anticancerígenos es la inducción de apoptosis (Ferreira 2002). Hay muchas evidencias de resistencia de células tumorales a la muerte celular apoptótica (Kim 2005). Este fenómeno podría explicarse mediante la sobreexpresión de moléculas de señalización con propiedades antiapoptóticas (Gabriel 2003). Una característica extremadamente interesante de GIT27-NO es su potencial para adaptar el mecanismo tumorocida a la especificidad celular. La línea celular L929, que es de origen mesodérmico, se murió principalmente a través de apoptosis. De acuerdo con esto, se notificó que NO-aspirina puede inducir apoptosis en células cancerosas de colon, mientras que el otro fármaco, NO-sulindaco es responsable de la muerte apoptótica de carcinoma de vejiga y próstata (Gao 2005, Huguenin 2004). A diferencia de las células L929, sólo se detectó una pequeña cantidad de células hipodiploides en las células B16 y C6 tratadas con GIT27-NO. Por otro lado, GIT27-NO indujo autofagia en cultivos de las líneas celulares C6 y B16. La inducción de autofagia como un modo de acción de la radiación y los fármacos anticancerígenos, tales como tamoxifeno, aloe-emodina, trióxido de arsénico y otros se notificó recientemente (Mijatovic 2005, Kanzawa 2004, 2003, Bilir, Paglin, Gorka). El tratamiento de células con inhibidores específicos, 3-MA y bafilomicina A restaura la viabilidad celular, confirmando que en estas

condiciones la autofagia actúa como mecanismo de destrucción más que de salvamento. El rescate eficaz de las células frente a la toxicidad inducida por GIT27-NO mediante el inhibidor conocido de PI-3K, 3-MA, señaló la importancia de esta ruta, que podría ser objeto de investigación adicional. Están bien documentadas las interacciones entre la muerte celular apoptótica y autofágica. Estos dos tipos de muerte celular podrían coexistir en la célula y, dependiendo de las circunstancias, podrían desencadenarse o inhibirse entre sí (Kim 2006). Sin embargo, aunque aloe-emodina se considera un agente de inducción apoptótica, se ha descubierto que este fármaco actúa preferentemente a través de la inducción de muerte celular autofágica en líneas celulares de glioma (Pecere 2000, CMLS 2005). Resulta interesante que GIT27-NO no pueda liberar espontáneamente NO, como lo hacen los donadores exógenos, pero en presencia de células pudo detectarse una cantidad significativa de nitrito. Por tanto, es obvio que para la liberación de NO, GIT27-NO requiere el contacto con células. Además, la hemoglobina que elimina NO neutralizó casi por completo el efecto de este compuesto, confirmando el papel crucial de NO en la supresión del crecimiento tumoral. Se sabe que NO es una especie altamente reactiva con fuerte afinidad por grupos tiol de aminoácidos libres, péptidos o proteínas, propiedades de donación de electrones y/o capacidad para formar nuevos radicales libres (Schindler 2001). Se mostró previamente que ERO y ERN median la muerte celular apoptótica y autofágica (Li 2005, Kanzawa 2004, Erdal 2005). El tratamiento de células con VGX-1027 no liberó ERO (datos no mostrados) mientras que se determinaron cantidades significativas de ERO en presencia de GIT27-NO. DHR también detectó peroxinitrito, que es el producto de reacción de  $O_2^-$  y NO y es realmente una de las moléculas más reactivas y destructoras (Lechner 2005, Li 2005). Resulta evidente que la liberación de NO desencadenó la producción de radicales reactivos, y como consecuencia, condujo a la reducción de la viabilidad celular, lo que se verificó adicionalmente mediante tratamiento con el antioxidante NAC. En línea con este estudio, Gao *et al.* mostraron que la aspirina donadora de NO induce apoptosis en células cancerosas de colon humano a través de la inducción de estrés oxidativo. (Gao PNAS). Además, se sabe que NO modula drásticamente la actividad de enzimas y factores de transcripción y, por consiguiente, altera rutas de señalización celular implicadas en la regulación de los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular (Schindler 2001). El efecto antitumoral de la aspirina donadora de NO está mediado por la activación de MAP cinasas (Hundley 2005). Estos autores notificaron que el fármaco donador de NO activó JNK y p38 en células cancerosas de colon y por tanto condujo a la activación del complejo AP-1, mientras que la inhibición de estas cinasas por inhibidores específicos bloqueó parcialmente el efecto citotóxico del fármaco. GIT27-NO modifica de manera diferencial la actividad de miembros de la familia de MAP cinasas dependiendo del tipo celular. Mientras que en las células L929 GIT27-NO indujo una fuerte regulación por incremento dependiente del tiempo de ERK1/2, seguido por la regulación por incremento transitoria de p-38, el tratamiento de células B16 con el mismo agente dio como resultado una fuerte fosforilación de JNK y sólo un ligero aumento de p38. Las células de glioma C6 regularon por incremento simultáneamente JNK y ERK durante el tratamiento, mientras que la actividad de p38 no se vio afectada. Se plantea la hipótesis de que la variación de la respuesta celular a GIT27-NO está relacionada con el mecanismo de muerte celular. Se sabe que la fuerte activación de ERK1/2 en células L929 inducida por cisplatino conduce las células a apoptosis, y su supresión neutralizó el potencial antitumoral del fármaco. Por tanto, ERK1/2 regulado por incremento podría ser el posible motivo para la apoptosis preferente de las células L929 tras el tratamiento con GIT27-NO. Merece la pena mencionar que la inhibición de PTK en las tres líneas celulares sometidas a prueba contrarrestó la citotoxicidad del fármaco. Esto puso de manifiesto que la acción farmacológica era la misma al principio y que podrían resultar diferencias de la activación de diferentes rutas de señalización en cada línea celular. Ya se ha mencionado que los NO-AINE son una clase sumamente prometedora de fármacos para varios trastornos, incluyendo el cáncer (Rigas 2004 *rew*). Los NO-AINE previnieron la carcinogénesis intestinal en ratones Min, modelo de rata de cáncer de colon y también cáncer pancreático en un modelo de tumor de hámster (Ouang, Bak, Williams, Rao). Debe resaltarse que GIT27-NO suprimió significativamente el crecimiento de melanoma B16 en ratones C57BU6. La transformación funcional del compuesto original determinó intensas propiedades tumorocidas mediadas principalmente por NO. La capacidad de adaptación del mecanismo de acción para cada tipo de células tratadas es ventajosa en comparación con otros fármacos quimioterápicos. Estos resultados podrían ser un punto de partida para la investigación adicional de posibles usos terapéuticos del compuesto (I).

## 50 Descripción de las figuras

Figura 1. GIT27-NO regula por disminución la viabilidad de células tumorales a través de la liberación de NO. Se trataron células de melanoma B16, fibrosarcoma L929 y astrocitoma C6 ( $1 \times 10^4$ /pocillo) con diferente concentración de o bien VGX-1027 o bien GIT27-NO. Tras cultivo durante 24 h se determinó la viabilidad celular mediante la prueba de MTT (A, B) y VC (C). Se detectó acumulación de nitritos en medios de cultivo (D) tras el tratamiento durante 24 h de células C6 en presencia de GIT27-NO, o en las diluciones indicadas de GIT27-NO sin células. Se realizaron el ensayo de MTT (E) y análisis de microscopía óptica (F) de células C6 tratadas durante 24 h con hemoglobina (12,5  $\mu$ M) en paralelo con GIT27-NO (25 mg/ml) tras la incubación durante 24 h. Los datos se presentan como la media  $\pm$  D.E. de representantes de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , se refiere a cultivos no tratados.

Figura 2. Diferente eficacia citotóxica hacia células C6, B16 y L929 y cinética de GIT27-NO. (A) Se incubaron las células con diferentes dosis de GIT27-NO durante 24 h, o alternativamente (B) con 25  $\mu$ g/ml de GIT27-NO para la evaluación cinética y se realizó el ensayo de liberación de LDH (\* $p < 0,05$ ). (C) Tras una incubación durante 24 h con 25  $\mu$ g/ml de GIT27-NO, se tiñeron las células con PI y se analizó el ciclo celular mediante citometría de flujo. (D) Se

trataron las células con 25 µg/ml de GIT27-NO durante 24 h, y se examinó la morfología nuclear característica de la apoptosis (flechas) mediante microscopía de fluorescencia tras la tinción con PI.

Figura 3. GIT27-NO induce la muerte celular autofágica en células B16 y C6. (A-D) Tras cultivo durante 24 h sin o con GIT27-NO (25 µg/ml), se tiñeron células B16 y C6 con naranja de acridina y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la presencia de vesículas autofágicas ácidas de color rojo anaranjado. (E) Se incubaron las células sin o con GIT27-NO (25 µg/ml), 3-MA (1 mg/ml), y/o Baf (0,5 µM) durante 24 h, tal como se indica, y se realizó el ensayo de MTT. \* $p < 0,05$  se refiere a un control adecuado. (F) Micrografías ópticas de células C6 incubadas durante 24 h sin (control) o con GIT27-NO (25 µg/ml) y/o 3-MA (1 mg/ml).

Figura 4. Participación de ERO en la acción citotóxica de GIT27-NO. (A-C) Se incubaron las células en ausencia (control) o presencia de GIT27-NO (25 µg/ml) y se detectó la producción de ERO mediante citometría de flujo de fluorescencia de DHR tras 24 h. (D) Se determinó la viabilidad de células incubadas sin o con GIT27-NO (25 µg/ml) en presencia o ausencia de antioxidante NAC (2,5 µM) tras 24 h mediante el ensayo de MTT. \* $p < 0,05$ , se refiere a un control adecuado.

Figura 5. GIT27-NO regula de manera diferencial la activación de MAP cinasas y PTK. (A-C) Se incubaron las células con 25 µg/ml de GIT27-NO y se valoró la activación de JNK, ERK, y p38 MAPK mediante ELISA basado en células en los puntos de tiempo indicados. Los datos se presentan como las veces de aumento con relación a los valores obtenidos en cultivos control no tratados en el punto de tiempo 0 (\* $p < 0,05$ ). (D-G) Se incubaron las células sin (control) o con GIT27-NO (25 µg/ml) en presencia o ausencia de los inhibidores específicos PD98059 (PD, 50 µM), SP600125 (SP, 0,75 µM), SB202190 (SB, 20 µM) o tirfostina (Tyr, 5 µM) y se realizó el ensayo de MTT tras una incubación durante 24 h. \* $p < 0,05$  se refiere a un control adecuado. (G) Micrografías ópticas de células C6 incubadas durante 24 h sin (control) o con GIT27-NO (25 µg/ml) y/o de Tyr (5 µM).

#### Bibliografía

Del Soldato P, Sorrentino R, Pinto A. NO aspirins: a class of new antiinflammatory and antithrombotic agents. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20(8): 319-23.

Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, Miljkovic Dj, Harhaji Lj, Vuckovic O, Stosic-Grujicic S, Mostarica Stojkovic M, Trajkovic V. Anti-glioma action of aloe emodin: the role of ERK inhibition. *Cell. Mol. Life Sci* 2005; 62: 589-98.

Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, Popadic D, Momcilovic M, Harhaji Lj, Miljkovic D, Trajkovic V. Aloeemodin prevents cytokine-induced tumor cell death: the inhibition of auto-toxic nitric oxide release as a potential mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* 2004; 61:1805-15.

Kang W, Nielsen O, Fenger C, Leslie G, Holmskov U, Reid KB. Induction of DMBT1 expression by reduced ERK activity during a gastric mucosa differentiation-like process and its association with human gastric cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26:1129-37.

Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 1998; 115: 61-9.

Kaludjerovic GN, Miljkovic D, Momcilovic M, Djinic VM, Mostarica Stojkovic M, Sabo TJ, Trajkovic V. Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int J Cancer* 2005; 116:479-86.

Smagur A, Szary J, Szala S. Recombinant angiostatin secreted from mouse melanoma cells inhibits growth of primary tumours. *Acta Biochim Pol* 2005; 52:875-9.

Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 2004; 11:448-57.

Versteeg H.H., Nijhuis E., van den Brink G.R., Evertzen M., Pynaert G.N., et al. (2000) A new phosphospecific cellbased ELISA for p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, protein kinase B and cAMP-response-element-binding protein. *Biochem. J.* 350: 717-22.

Rao CV, Reddy BS, Steele VE, Wang CX, Liu X, Ouyang N, Patolla JM, Simi B, Kopelovich L, Rigas B. Nitric oxidereleasing aspirin and indomethacin are potent inhibitors against colon cancer in azoxymethane-treated rats: effects on molecular targets. *Mol Cancer Ther.* 2006 Jun; 5(6):1530-8.

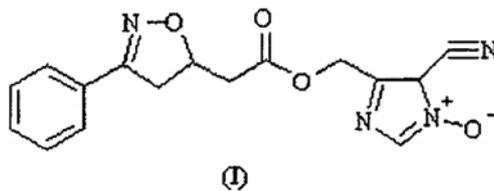
Ouyang N, Williams JL, Tsioulis GJ, Gao J, Iatropoulos MJ, Kopelovich L, Kashfi K, Rigas B. Nitric oxide-donating aspirin prevents pancreatic cancer in a hamster tumor model. *Cancer Res.* 2006 Apr 15; 66(8):4503-11.

- Gao J, Liu X, Rigas B. Nitric oxide-donating aspirin induces apoptosis in human colon cancer cells through induction of oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Nov 22; 102(47):17207-12.
- 5 Hundley TR, Rigas B. Nitric oxide-donating aspirin inhibits colon cancer cell growth via mitogen-activated protein kinase activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Jan; 316(1):25-34.
- Spiegel A, Hundley TR, Chen J, Gao J, Ouyang N, Liu X, Go MF, Tsioulis GJ, Kashfi K, Rigas B. NO-donating aspirin inhibits both the expression and catalytic activity of inducible nitric oxide synthase in HT-29 human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2005 Oct 1; 70(7):993-1000.
- 10 Nath N, Labaze G, Rigas B, Kashfi K. NO-donating aspirin inhibits the growth of leukemic Jurkat cells and modulates beta-catenin expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jan 7; 326(1):93-9.
- 15 Rigas B, Kashfi K. Nitric-oxide-donating NSAIDs as agents for cancer prevention. *Trends Mol Med*. 2004 Jul; 10(7):324-30.
- Yeh RK, Chen J, Williams JL, Baluch M, Hundley TR, Rosenbaum RE, Kalala S, Traganos F, Benardini F, del Soldato P, Kashfi K, Rigas B. NO-donating nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) inhibit colon cancer cell growth more potently than traditional NSAIDs: a general pharmacological property? *Biochem Pharmacol*. 2004 Jun 15; 67(12):2197-205.
- 20 Williams JL, Kashfi K, Ouyang N, del Soldato P, Kopelovich L, Rigas B. NO-donating aspirin inhibits intestinal carcinogenesis in Min (APC(Min/+)) mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jan 16; 313(3):784-8.
- 25 Kashfi K, Ryan Y, Qiao LL, Williams JL, Chen J, Del Soldato P, Traganos F, Rigas B. Nitric oxide-donating nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of various cultured human cancer cells: evidence of a tissue type-independent effect. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Dec; 303(3):1273-82.
- 30 Stosic-Grujicic S, Cvetkovic I, Mangano K, Fresta M, Maksimovic-Ivanic D, Harhaji L, Popadic D, Momcilovic M, Miljkovic D, Kim J, Abed YA, Nicoletti F. A Potent Immunomodulatory Compound, (S,R)-3-Phenyl-4,5-dihydro-5-isoxazole Acetic Acid, Prevents Spontaneous and Accelerated Forms of Autoimmune Diabetes in NOD Mice and Inhibits the Immunoinflammatory Diabetes Induced by Multiple Low Doses of Streptozotocin in CBA/H Mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Mar; 320(3):1038-49.
- 35 Huguenin S, Vacherot F, Fleury-Feith J, Riffaud JP, Chopin DK, Bolla M, Jaurand MC. Evaluation of the antitumoral potential of different nitric oxide-donating non-steroidal anti-inflammatory drugs (NO-NSAIDs) on human urological tumor cell lines. *Cancer Lett*. 2005 Feb 10; 218(2):163-70.
- 40 Huguenin S, Fleury-Feith J, Kheuang L, Jaurand MC, Bolla M, Riffaud JP, Chopin DK, Vacherot F. Nitrosulindac (NCX 1102): a new nitric oxide-donating non-steroidal anti-inflammatory drug (NO-NSAID), inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostatic epithelial cell lines. *Prostate*. 2004 Oct 1; 61(2):132-41.
- 45 Huguenin S, Vacherot F, Kheuang L, Fleury-Feith J, Jaurand MC, Bolla M, Riffaud JP, Chopin DK. Antiproliferative effect of nitrosulindac (NCX 1102), a new nitric oxide-donating non-steroidal anti-inflammatory drug, on human bladder carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther*. 2004 Mar; 3(3):291-8.
- Bak AW, McKnight W, Li P, Del Soldato P, Calignano A, Cirino G, Wallace JL. Cyclooxygenase-independent chemoprevention with an aspirin derivative in a rat model of colonic adenocarcinoma. *Life Sci*. 1998; 62(23):PL 367-73.
- 50 Schindler H, Bogdan C. NO as a signaling molecule: effects on kinases. *Int Immunopharmacol*. 2001 Aug; 1(8):1443-55.
- 55 Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res* 2003; 63: 2103-8.
- Bilir A, Altinoz MA, Erkan M, Ozmen V, Aydiner A. Autophagy and nuclear changes in FM3A breast tumor cells after epirubicin, medroxyprogesterone and tamoxifen treatment in vitro. *Pathobiology* 2001; 69:120-6.
- 60 Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 2001; 61: 439-44.
- 65 Gorka M, Daniewski WM, Gajkowska B, Lusakowska E, Godlewski MM, Motyl T. Autophagy is the dominant type of programmed cell death in breast cancer MCF-7 cells exposed to AGS 115 and EFDAC, new sesquiterpene analogs of paclitaxel. *Anticancer Drugs* 2005; 16:777-88.

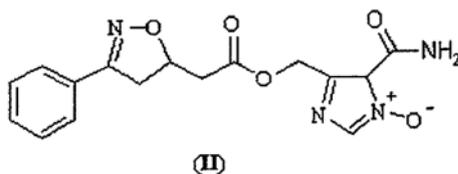
- Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Uchida Y, Arihiro Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death *J Pathol.* 2006 Feb; 208(3):319-26.
- 5 Pecere T, Gazzola MV, Mucignat C, Parolin C, Vecchia FD, Cavaggioni A, Basso G, Diaspro A, Salvato B, Carli M, Palu G. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 2000; 60: 2800-4.
- 10 Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, Miljkovic D, Kaludjerovic GN, Sabo TJ, Trajkovic V. Aloe emodin decreases the ERK-dependent anticancer activity of cisplatin. *Cell Mol. Life Sci.* 2005 Jun; 62(11):1275-82.
- 15 Tarr JM, Eggleton P, Winyard PG. Nitric oxide and the regulation of apoptosis in tumour cells. *Curr Pharm Des.* 2006; 12(34):4445-68.
- Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radic Biol Med.* 2003 Apr 15; 34(8):955-68.
- 20 Keeble JE, Moore PK. Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs. *Br J Pharmacol.* 2002 Oct; 137(3):295-310.
- 25 Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene.* 2004 Apr 12; 23(16): 2838-49.
- Erdal H, Berndtsson M, Castro J, Brunk U, Shoshan MC, Linder S. Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Jan 4; 102(1):192-7.
- Mitra R, Singh S, Khar A: Antitumour immune responses. *Expert Rev Mol Med.* 2003 Jan 13; 2003:1-22.
- 30 Gabriel B, Sureau F, Casselyn M, Teissie J, Petit PX. Retroactive pathway involving mitochondria in electroloaded cytochrome c-induced apoptosis. Protective properties of Bcl-2 and Bcl-XL. *Exp Cell Res.* 2003 Oct 1; 289(2): 195-210.
- Li CQ, Wogan GN. Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett.* 2005 Aug 8; 226(1):1-15.
- 35 Lechner M, Lirk P, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol.* 2005 Aug; 15(4):277-89.
- 40 Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA, Giaccone G. Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2002 Jul; 8 (7):2024-34.
- 45 Ivana Stojanovic; Salvatore Cuzzocrea; Katia Mangano; Emanuela Mazzon; Djordje Miljkovic; Mingjun Wang; Marco Donia; Yousef Al Abed; Joseph Kim; Stanislava Stosic-Grujicic; Mogens Claesson. In vitro, ex vivo and in vivo immunopharmacological activities of the isoxazoline compound VGX-1027: Modulation of cytokine synthesis and prevention of both organ-specific and systemic autoimmune diseases in murine models. *Clin Immunol*, in press.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)



5 2. Compuesto de fórmula (II)



3. Composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto según la reivindicación o 2 en mezcla con vehículos y/o excipientes adecuados.

10 4. Compuesto de fórmula I para el tratamiento de tumores.

5. Compuesto de fórmula I para el tratamiento de infecciones virales.

15 6. Compuesto de fórmula I para el tratamiento de acontecimientos inmunoinflamatorios del hígado tales como los que se producen durante hepatitis B y C aguda o crónica así como hepatitis autoinmunitaria.

7. Compuesto de fórmula I para el tratamiento de úlcera gástrica, choque hemorrágico y varios estados asociados con daño tisular durante isquemia-reperfusión y estados asociados.

Fig. 1

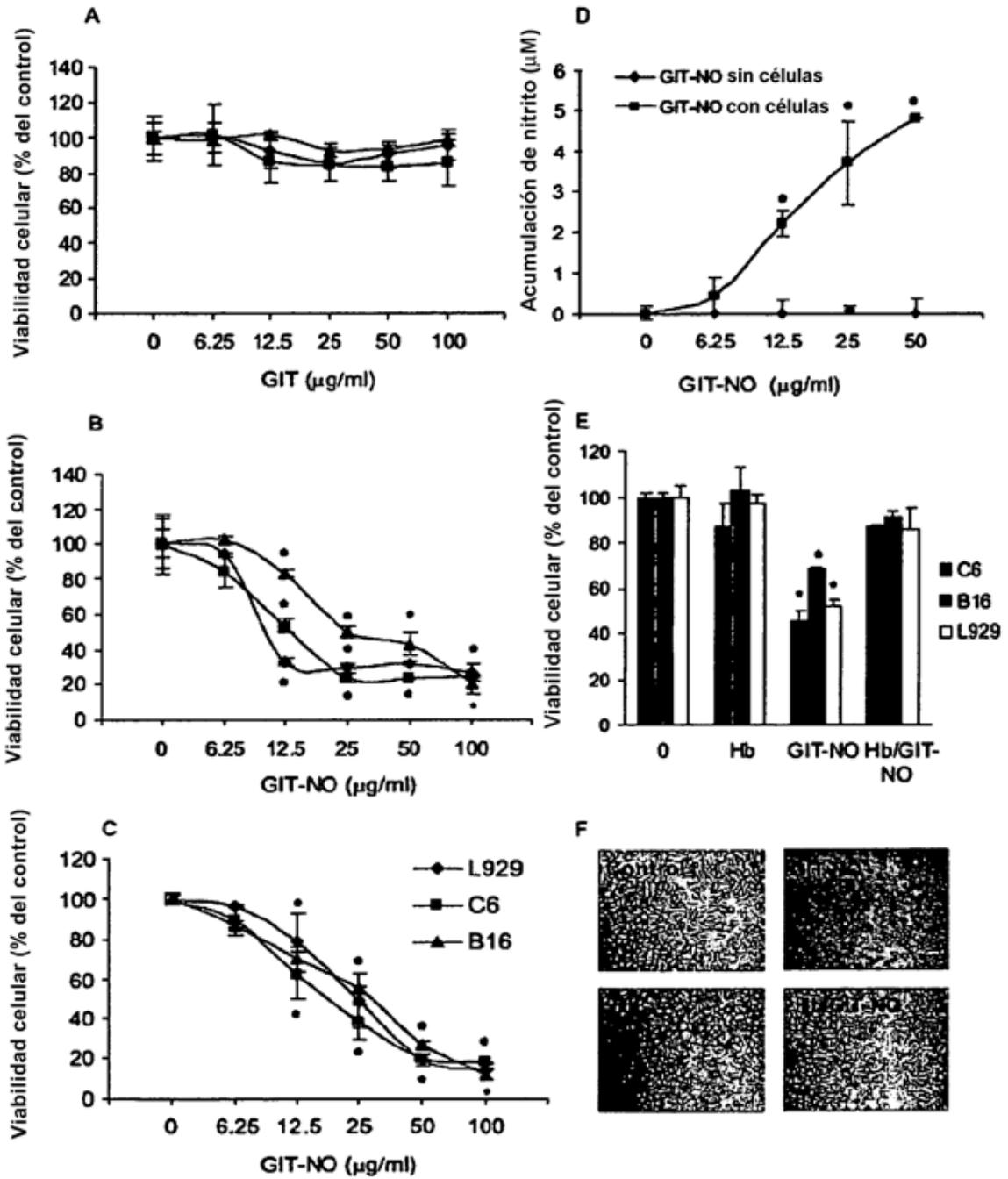
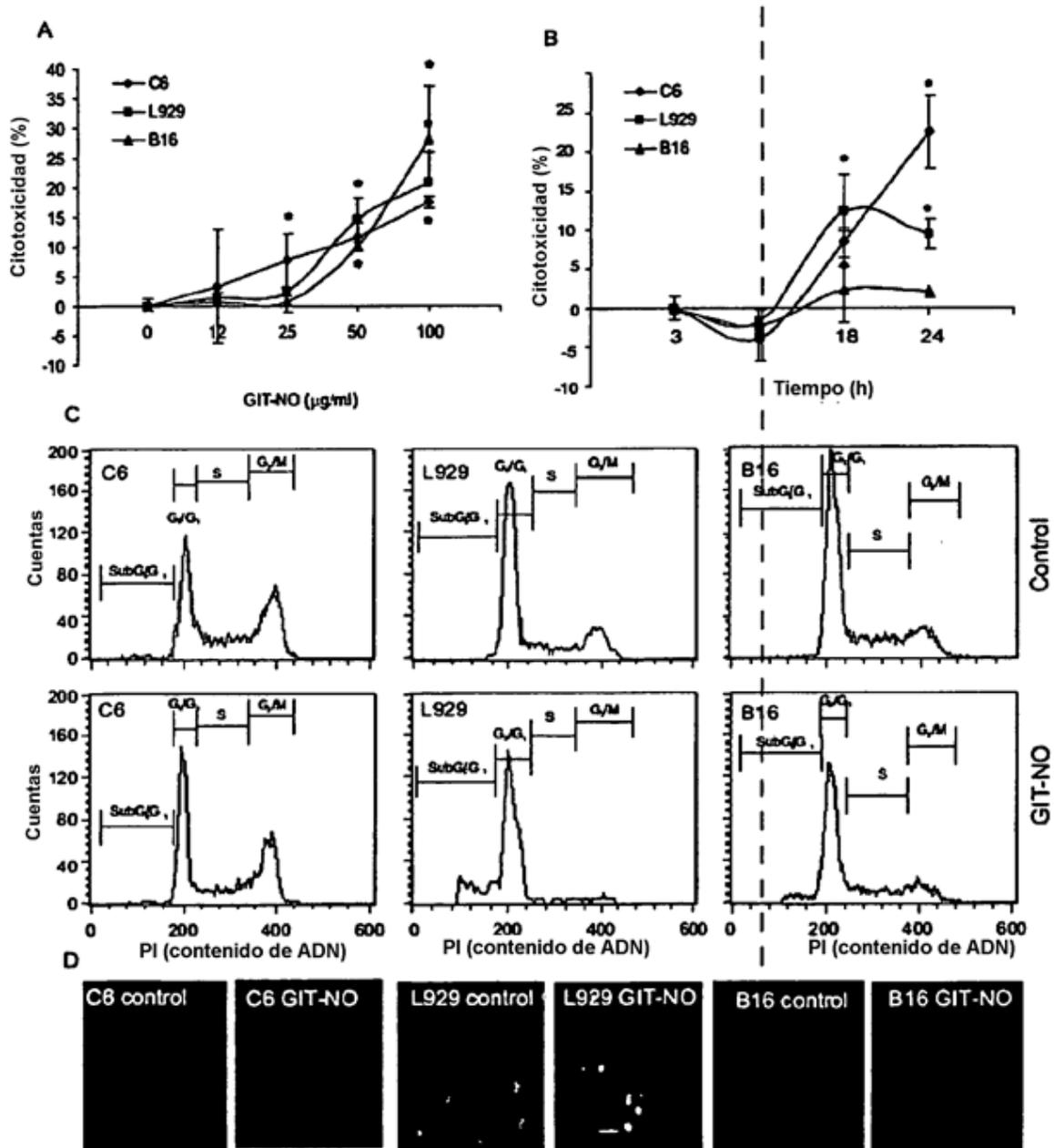


Fig. 2



**Fig. 3**

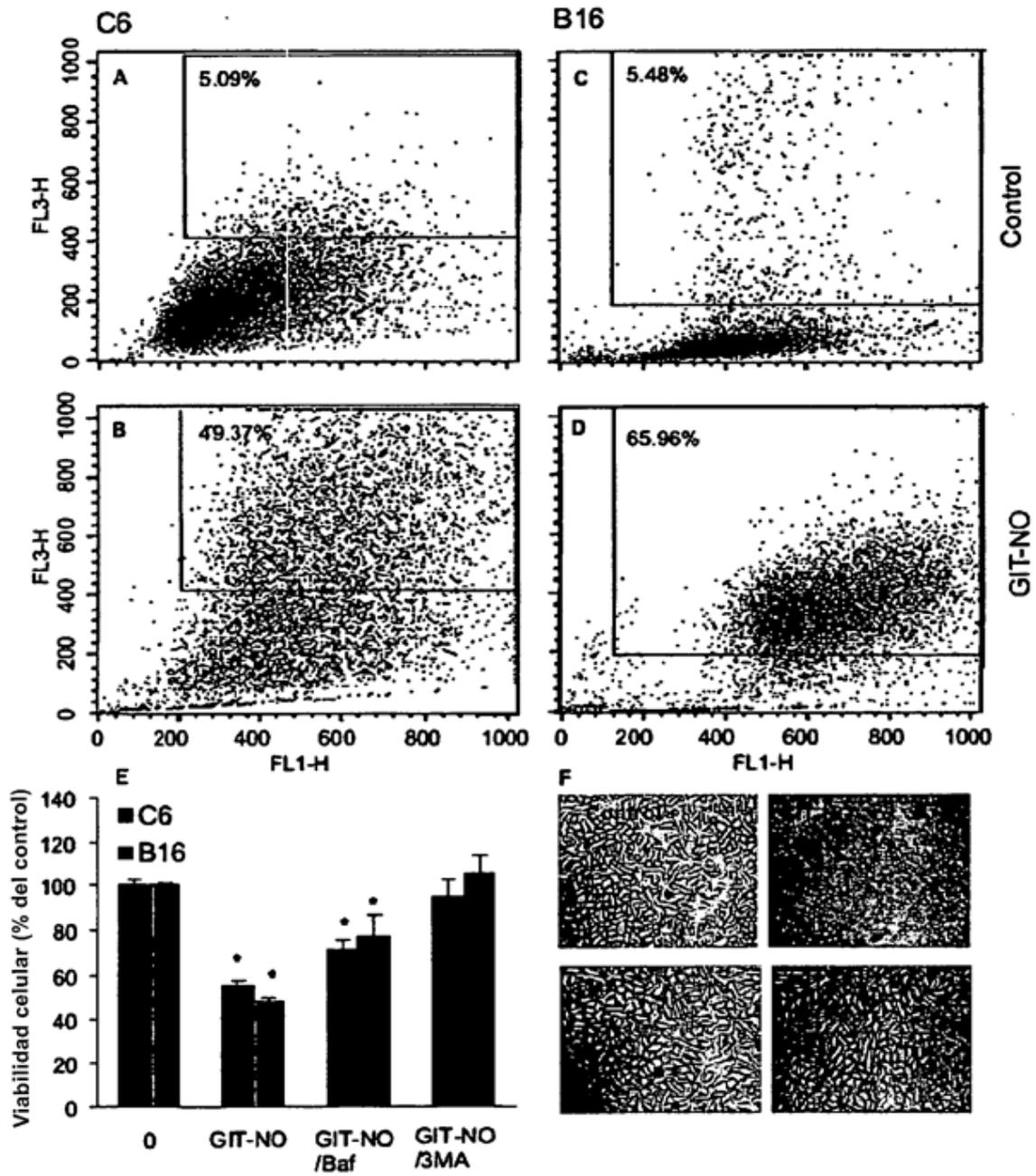
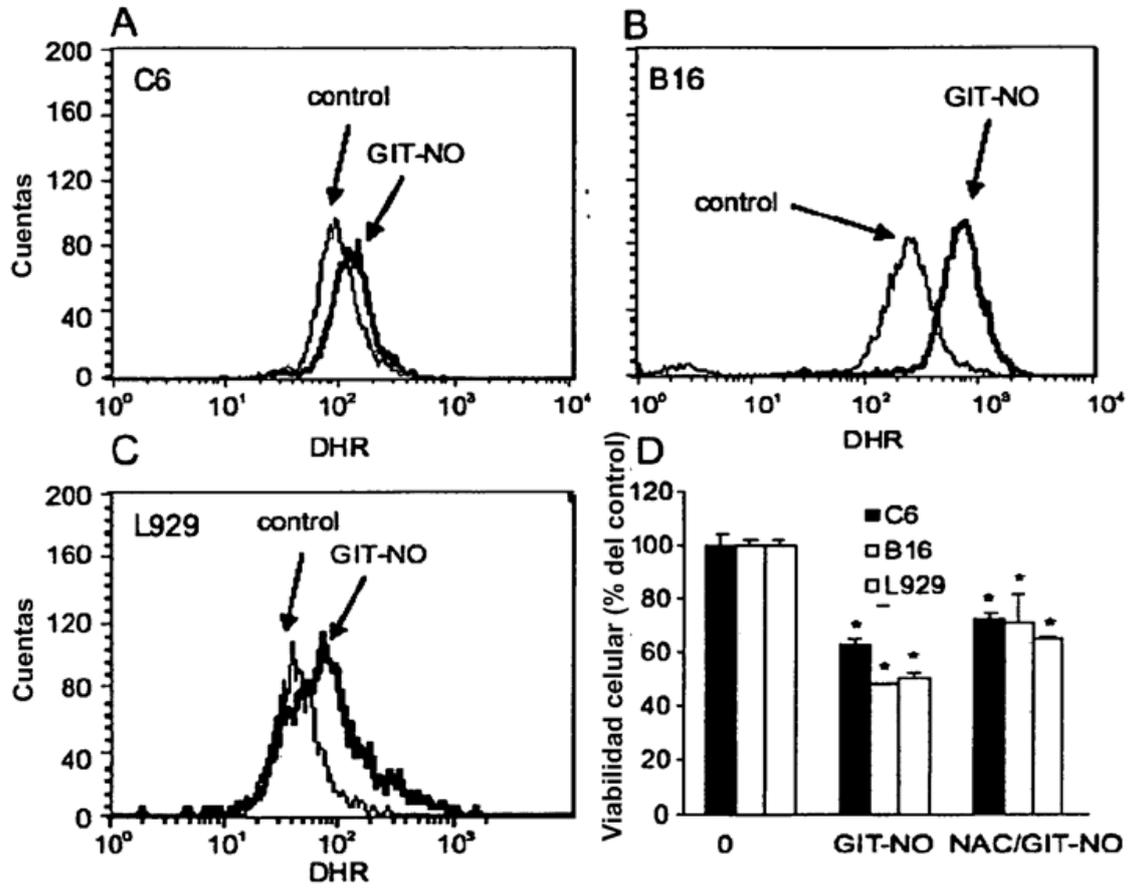


Fig. 4



**Fig. 5**

