

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 717**

51 Int. Cl.:
C07D 209/30 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08763019 .0**
96 Fecha de presentación: **28.02.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2137147**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.12.2009**

54 Título: **DERIVADOS NOVEDOSOS DE LA PSAMMAPLINA A, UN MÉTODO PARA SU SÍNTESIS Y SU USO PARA LA PREVENCIÓN O EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.**

30 Prioridad:
28.02.2007 EP 07290253

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.01.2012

73 Titular/es:
**Centre National de la Recherche Scientifique
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR;
Seconda Università degli Studi di Napoli;
Universidad de Vigo;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM);
Université de Strasbourg y
Radboud University Nijmegen**

72 Inventor/es:
**GRONEMEYER, Hinrich;
ALTUCCI, Lucia;
DE LERA, Angel y
STUNNENBERG, Hendrik Gerard**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

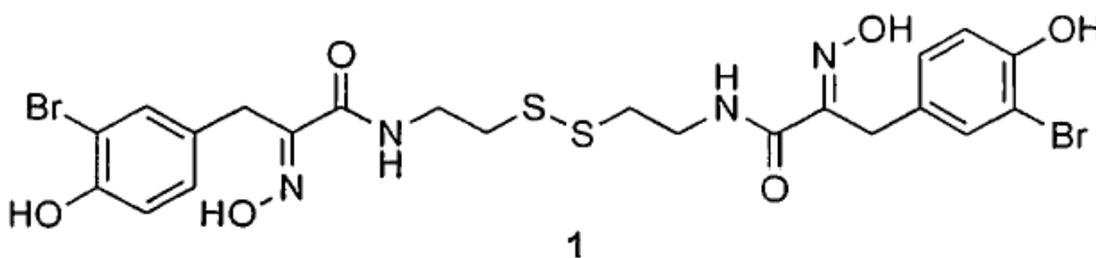
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar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

ES 2 372 717 T3

DESCRIPCIÓN

Derivados novedosos de la psammaplina a, un método para su síntesis y su uso para la prevención o el tratamiento del cáncer

5 La invención se relaciona con derivados novedosos de psammaplina A, un método para su síntesis y su uso para la prevención y/o el tratamiento de un cáncer o un tumor.



psammaplina A

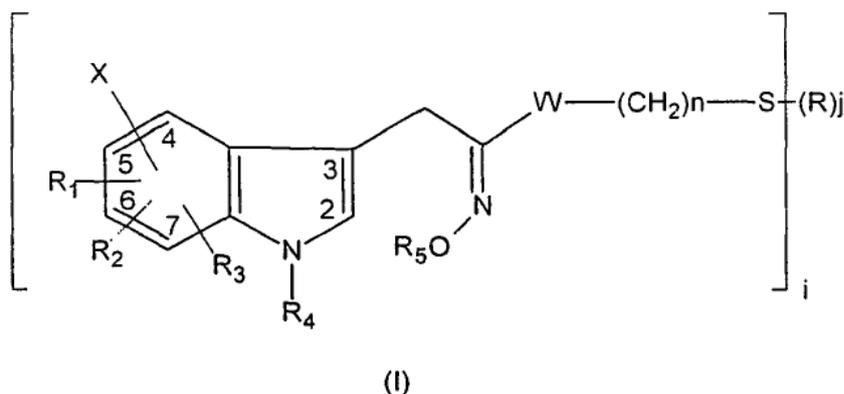
La psammaplina A (**1**) es un dímero disulfuro simétrico derivado de la bromotirosina que fue aislado originalmente en 1987 a partir de una esponja no identificada (Arabshahi, L.; Schmitz, F. J. *J. Org. Chem.* 1987, 52, 3584-3586), *Thorectopsamma xana* (Rodríguez, A. D. et al., *Tetrahedron Lett.* 1987, 28, 4989-4992) y *Psammaplysilla* sp (Quinñoa, E.; Crews, P. *Tetrahedron Lett.* 1987, 28, 3229-3232). Los primeros estudios revelaron que la psammaplina A tenía propiedades antibacterianas y antitumorales generales. En 1999, se encontró que la psammaplina A mostraba significativa actividad antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* (SA) y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA), con lo cual se dedujo que es el resultado de la detención de la síntesis de ADN bacteriano inducida por la psammaplina A a través de la inhibición de la girasa de ADN (Kim, D. et al., *Arch. Pharm. Res.* 1999, 22, 25-29). Adicionalmente, se ha reportado que la psammaplina A muestra cierta inhibición de un número de enzimas incluyendo topoisomerasa II (topo II) (Kim, D. et al., *Anticancer Res.* 1999, 19, 4085-4090), farnesil proteína transferasa y aminopeptidasa (Shin, J. et al., *J. Tetrahedron* 2000, 56, 9071-9077), y quitinasa, como se reporta recientemente (Tabudravu, J.N. et al., *Bioorg. Med. Chem* 2002, 10, 1123-1128). Entre estas enzimas, la topo II, necesaria para la replicación del ADN eucariota, así como la girasa de ADN bacteriano, pertenece a la familia topoisomerasa de las enzimas responsables de la remodelación de la topología del ADN. Se ha reportado recientemente que la psammaplina A mostraba significativa citotoxicidad contra las líneas celulares del cáncer de pulmón humano (A549), ovario (SKOV-3), piel (SK-MEL-2), CNS (XF498), y colon (HCT15) (Park, Y. et al., *J Nat. Prod.* 2003, 66, 1495-1498). Otros estudios sugieren que la citotoxicidad de la psammaplina A se puede relacionar con el efecto inhibitorio que tiene el proceso celular fundamental-replicación del ADN, y una de las principales moléculas diana de la psammaplina A podría ser la *pou1*-primasa (Jiang, Y. et al., *BMC Cancer* 2004, 4:70). Recientemente, **1** se ha encontrado como un potente inhibidor de APN, una metaloproteína necesaria para la invasión y la angiogénesis del tumor (Shima, J. S. et al., *J. Cancer Letters* 2004, 203, 163-169).

Entre las bioactividades reportadas atribuidas a la psammaplina A (**1**), la más importante es quizás su capacidad para inhibir las enzimas que desacetilan las histonas, conocidas como histona desacetilasas (HDAC) (IC₅₀ 4.2 nM, *in vitro* ensayo de enzima libre de células) (Piña, I. C. et al., *J. Org. Chem.* 2003, 68, 3866-3873). Varios inhibidores de HDAC están en fase de ensayos clínicos como potenciales agentes quimioterapéuticos moleculares dirigidos contra el cáncer (Remiszewski, S. W. *Curr. Med. Chem.* 2003, 10, 2393-2402). Aunque **1** inhibió el crecimiento del tumor tanto *in vitro* como *in vivo*, su pobre estabilidad fisiológica impidió su desarrollo como fármaco. La inestabilidad de **1** bajo condiciones fisiológicas (o pobre penetración de la membrana celular) puede explicar por qué la inhibición de HDAC en un ensayo basado en células necesita una concentración de **1** que es 1800 veces mayor de la concentración necesaria para inhibir HDAC en un ensayo basado en la enzima.

Durante el curso del desarrollo de los inhibidores de HDAC potentes y selectivos, se demostró que las unidades estructurales amida derivadas de los ácidos heteroaromáticos pueden servir como residuos terminales útiles de los inhibidores de HDAC. La síntesis de una serie de ácidos hidroxámicos de amidas heterocíclicas demostró la alta potencia de las indolamidas, en particular indol carboxamidas con sustitución en la posición 2, como HDACis (Dai, Y. et al.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 1897-1901).

Un objeto de la invención fue obtener nuevas moléculas con una estructura análoga a la de la psammaplina A y una actividad biológica significativa sobre líneas celulares cancerosas.

Un objeto de la invención es una molécula que responde a la siguiente fórmula (I):



donde:

n es un número entero seleccionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8;

5 i es un número entero seleccionado de 1, 2;

j es un número entero seleccionado de 0,1;

cuando i = 2, entonces j = 0 y cuando i = 1, entonces j = 1;

X es un átomo de halógeno;

10 W es un grupo de unión seleccionado de: -CO-NH-, -NH-CO-, -CO-O-, -O-CO-, -CO-S-, -S-CO-, -CH=CH-, en enlace covalente;

R es un grupo seleccionado de: un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo carboxialquilo C₁-C₆;

15 R¹, R², R³, idénticos o diferentes se seleccionan de: un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁-C₆, un grupo aminoalquilo C₁-C₆, un grupo heterocicloalquilo saturado C₁-C₆, un grupo arilo C₆-C₁₂, un grupo aralquilo C₆-C₂₀, un grupo heteroarilo C₄-C₁₂;

R⁴ se selecciona de: un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo acilo C₂-C₆, un grupo arilo C₆-C₁₂, un grupo aralquilo C₆-C₂₀, un grupo heteroarilo C₄-C₁₂;

R⁵ se selecciona de: un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo aralquilo C₆-C₂₀;

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

20 Un átomo de halógeno es un átomo seleccionado de: Cl, F, Br, I.

Un grupo alquilo C₁-C₆ significa una cadena alquímica, de lineal, ramificada o cíclica, que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono.

Un grupo haloalquilo C₁-C₆ significa una cadena alquímica, lineal, ramificada o cíclica, que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono y al menos un átomo de halógeno.

25 Un grupo alcoxi C₁-C₆ significa un grupo -O-alquilo, donde la cadena alquímica lineal, ramificada o cíclica, comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono.

Un grupo aminoalquilo C₁-C₆ significa un grupo -NH-alquilo, o un grupo -N-dialquilo, donde la cadena alquímica lineal, ramificado o cíclico, comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono.

ES 2 372 717 T3

Un grupo heterocicloalquilo C_1-C_6 saturado es una cadena cíclica saturada que comprende de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono y uno o dos heteroátomos, como N, O, S, como por ejemplo una pirrolidina, una piperidina, un tetrahydrofurano.

5 Un grupo arilo C_6-C_{12} es un grupo aromático que comprende 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 átomos de carbono, como un grupo fenilo o un grupo naftilo.

Un grupo aralquilo C_6-C_{20} comprende una cadena alquílica y al menos un grupo aromático y de 6 a 20 átomos de carbono, como un grupo bencilo o un grupo tritilo.

Un grupo heteroarilo C_4-C_{12} es un grupo aromático que comprende 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 átomos de carbono y uno o dos heteroátomos como N, O, S, como por ejemplo una piridina, un furano, una pirimidina.

10 Un grupo acilo C_2-C_6 es un grupo $-CO-$ alquilo en donde la cadena de alquilo comprende 1, 2, 3, 4 o 5 átomos de carbono.

Preferiblemente, se cumplen una o varias de las siguientes condiciones:

n es un número entero seleccionado de 2, 3, 4, 5, 6;

i es 2;

15 j es 0;

X es Br;

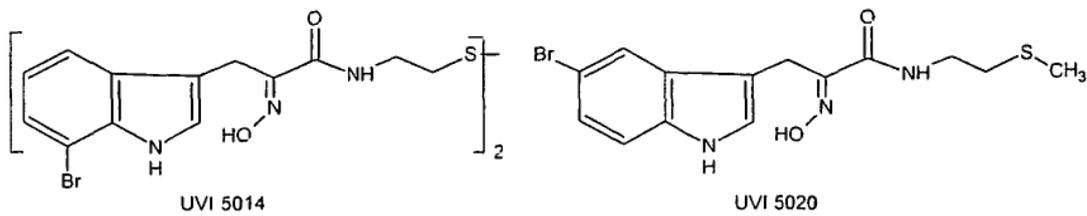
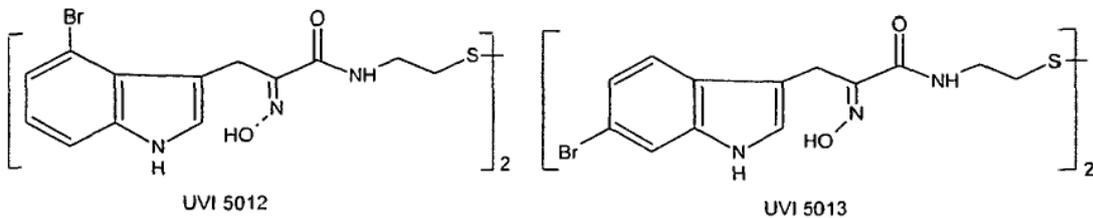
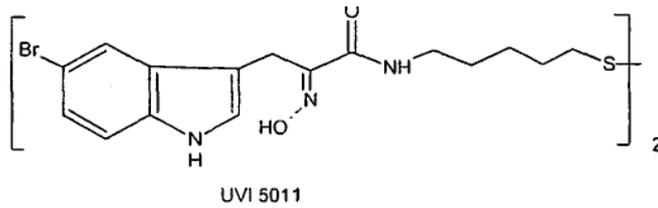
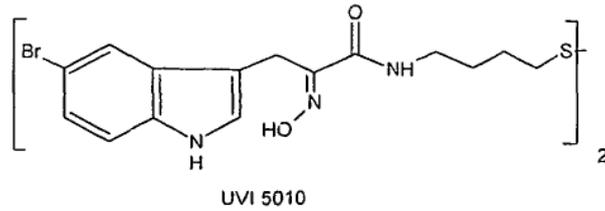
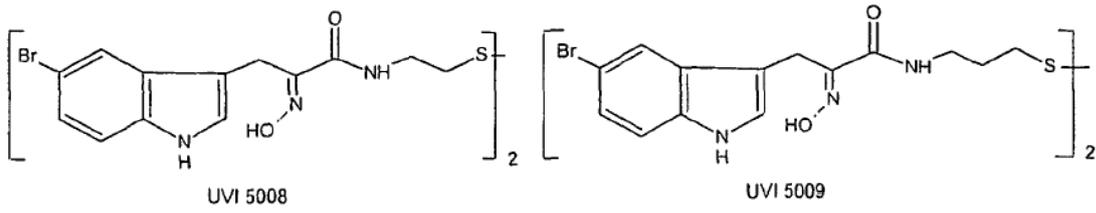
W es $-CO-NH-$;

R_1, R_2, R_3 son átomos de hidrógeno;

R_4 es H,

20 R_5 es H.

Las moléculas preferidas son aquellas incluidas en la siguiente lista:



Sorprendentemente, los inventores han descubierto que las moléculas que responden a la fórmula (I), tienen la propiedad de inhibir al menos una, mejor dos, e incluso preferiblemente tres etapas del ciclo celular de células cancerosas. Especialmente, las moléculas de fórmula (I) tienen una o más de las siguientes propiedades cuando entran en contacto con las células cancerosas:

5

- inducen la detención del ciclo celular,
- inducen la apoptosis,
- actúan como inhibidores de las histona desacetilasas (HDACs),

- actúan como inhibidores de metiltransferasas de ADN (DNMTs)
- inducen la expresión del ligando inductor de apoptosis TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*),
- actúan como inhibidores de SIRT1 y SIRT2 humanos.

5 Algunas moléculas de fórmula (I), también son útiles como intermedios para la síntesis de las moléculas biológicamente más activas.

10 Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de bases y ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Las sales apropiadas incluyen aquellas derivadas de metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre otros numerosos ácidos bien conocidos en el campo farmacéutico. En particular, ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son las sales de adición de ácidos orgánicos formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, alfa-cetoglutarato, y alfa-glicerofosfato. Las sales inorgánicas apropiadas también pueden ser formadas, incluyendo sales de sulfato, nitrato, bicarbonato, y carbonato. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden obtener utilizando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica.

15 Un objeto de la invención es un medicamento o una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de una molécula de fórmula (I) o una sal de ésta en un soporte farmacéuticamente aceptable.

20 De acuerdo con la invención, la composición incluye los portadores apropiados, tales como agua, y se formula para la ruta de administración deseada para un individuo con necesidad de la misma. Opcionalmente el compuesto se administra en combinación o alternancia con al menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento de tumores o del cáncer.

Otro objeto de la invención es el uso de una molécula de fórmula (I), para la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar un tumor o un cáncer en un individuo que así lo requiere. Este uso especialmente se interesa en la prevención y/o tratamiento de un cáncer seleccionado de: cáncer de pulmón, de ovario, del sistema nervioso central (CNS), de piel, y de colon, o de leucemia.

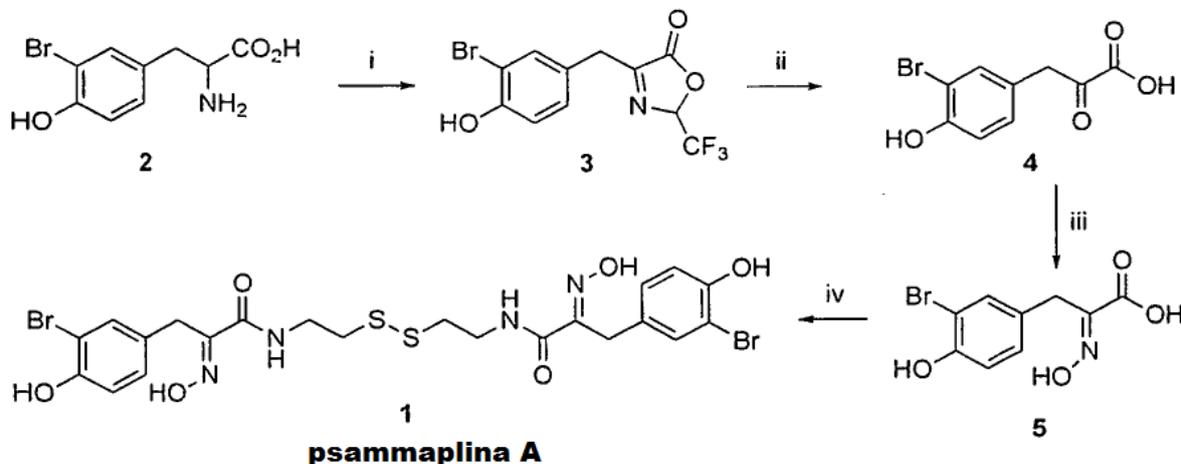
25 Tal como se utilizan en este documento, los términos cáncer y canceroso se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que por lo general se caracteriza por el crecimiento celular no regulado, y especialmente por trastornos proliferativos. Ejemplos de tales trastornos proliferativos incluyen, entre otros, cánceres tales como carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón de célula pequeña, 30 cáncer de pulmón de célula no-pequeña, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado (carcinoma hepático), cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, cáncer de riñón, y cáncer de tiroides.

35 Tal como se utiliza en este documento, el término tumor se refiere a un crecimiento celular neoplásico y proliferación, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosas y cancerosas. De forma notable, un cáncer puede ser caracterizado por una masa de tumor sólido. La masa de tumor sólido, si está presente, puede ser una masa de tumor primario. Una masa de tumor primario se refiere a un crecimiento de células cancerosas en un tejido resultante de la transformación de una célula normal de este tejido.

40 La dosificación y ritmo de administración del medicamento de la invención se adapta en vista de la actividad biológica de la molécula seleccionada de fórmula (I), de la edad y peso del paciente, del tipo e importancia del cáncer y/o tumor, y de la ruta de administración elegida.

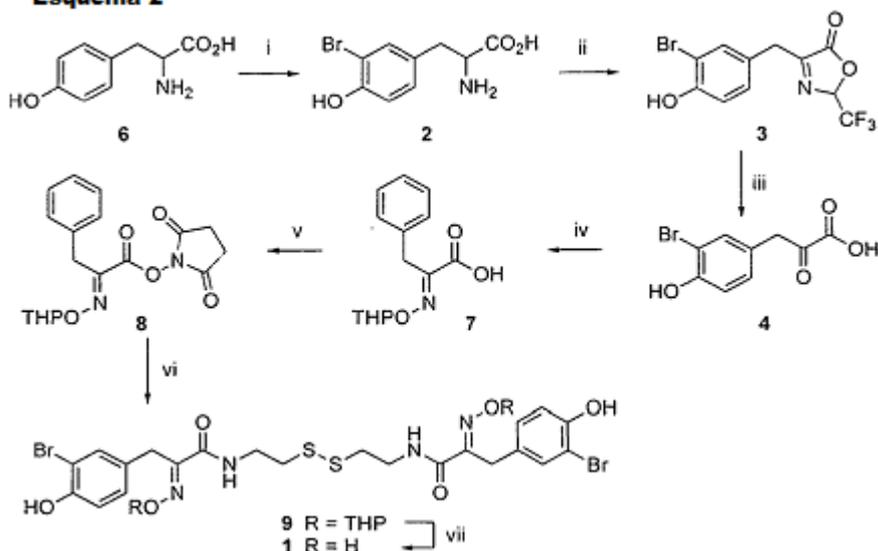
Otro objeto de la invención es un método para la síntesis de las moléculas de fórmula (I).

Hoshino et al. (Bioorg. Med. Chem. Lett. 1992, 2, 1561-1562) han reportado la síntesis de **1** a partir de 3-bromotirosina en 4 etapas (Esquema 1). La psammaplina (**1**) fue obtenida con 23 % de rendimiento a lo largo de las 4 etapas.

Esquema 1

Esquema 1. Reactivos y condiciones: (i) $(CF_3CO)_2O$, 80-120 °C, 1 h (61 %); (ii) 70% TFA acu., 25 °C, 12 h (97%); (iii) $HONH_2 \cdot HCl$, AcONa, EtOH, 25 °C (57%); (iv) DDC, N-hidroxifthalimida, Et_3N , cistamina, 1,4-dioxano-MeOH, 25 °C, 12 h (67%).

- 5 Las características esenciales de la metodología Hoshino, fueron incorporadas posteriormente en una metodología general para los derivados del tipo psammaplina A reportados por Nicolaou, (Nicolaou, K. et al., J. Chem. Eur. J. 2001, 7, 4250-4295) mostrada en el Esquema 2. Los análogos de Psammaplina 1 fueron obtenidos con 36% de rendimiento a lo largo de las 4 etapas a partir de 4 (Nicholaou, G. M. et al., A. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2002, 12, 2487-2490). La metodología de Nicolaou fue explicada en la preparación, vía intercambio de disulfuro inducido catalíticamente, de una biblioteca de 3828-miembros de análogos de psammaplina A que se seleccionan por sus propiedades antibacterianas (Nicolaou, G. M. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2002, 12, 2457-2490).
- 10

Esquema 2

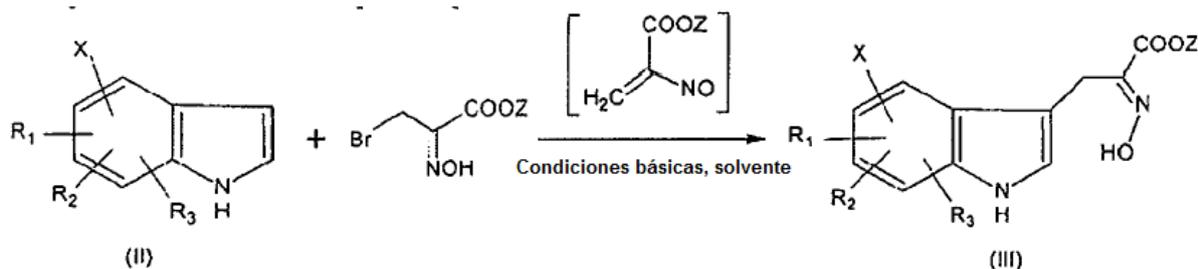
- Esquema 2 Reactivos y condiciones:** (i) $KBr \cdot KBrO_3$, H_2O , 23 °C, 12 h (81 %); (ii) TFAA, 80 °C, 12 h; (iii) 70% ac. TFA, 23 °C, 12 h (60%, 2 etapas); (iv) THP-ONH₂, EtOH, 23 °C, 12 h; (v) EDC, NHS, 1,4-dioxano, 23 °C, 2 h; (vi) Et_3N , cistamina-HCl, 1,4-dioxano-MeOH, 23 °C, 2 h; (vii) HCl, CH_2Cl_2 -MeOH, 60 °C, 2 h (36% de 7).
- 15

Estas síntesis totales dieron la psammaplina A, con una producción global probada. Debería mencionarse una síntesis reciente de la psammaplina A que evita las etapas de protección-desprotección del grupo oxima y produce

un mayor rendimiento (Godert, A. M. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16, 3330-3333). Otro objeto de la invención fue encontrar un método para la síntesis de los derivados de psammaplina A que debería ser simple, con altos rendimientos y que pudiera ser fácilmente industrializado.

5 Ahora los inventores han encontrado un método novedoso para la síntesis de los derivados de la psammaplina A del tipo indol-carboxamida sustituida en la posición 2, cuyo método es rápido, simple y produce altos rendimientos.

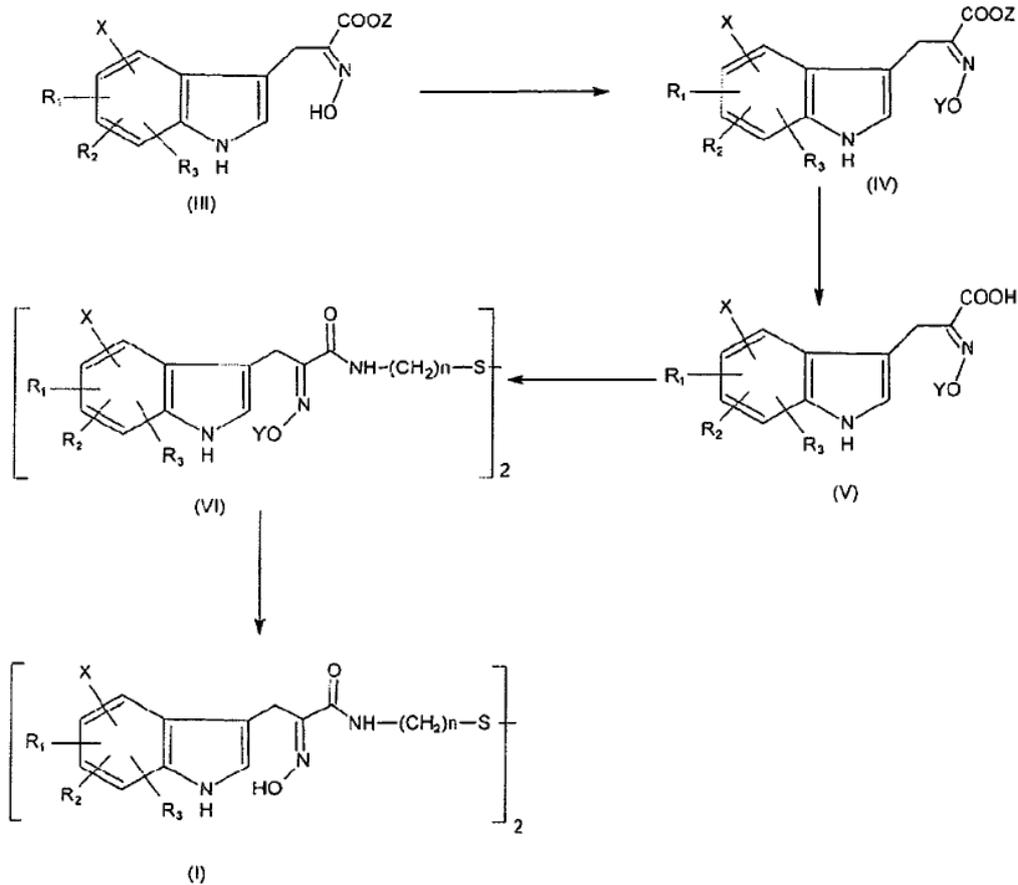
En el caso cuando $W = -CO-NH-$, el método de la invención se caracteriza por que comprende al menos una etapa como se describe en el esquema 3, en donde:



10 La síntesis descrita en el Esquema 3 se inicia con la alquilación del indol (II) con aproximadamente un equivalente de nitrosoacrilato $CH_2=C(NO)-COOZ$, en el cual Z representa un grupo seleccionado de: grupo alquilo C_1-C_6 , fenilo, arilo, como por ejemplo un grupo bencilo (Gilchrist, T. L.; Roberts T. G. J. Chem. Soc. Perkin Trans I 1983, 1283-1292), generado *in situ* a partir de la bromo-oxima correspondiente. Dicha bromo-oxima se prepara de manera conocida por la reacción de bromopiruvato de etilo con clorhidrato de hidroxilamina. Preferiblemente, la reacción se realiza en un medio básico, en un solvente, a temperatura ambiente. El solvente puede ser un solvente clorado similar a CH_2Cl_2 , $CHCl_3$, o $ClCH_2-CH_2Cl$, o el solvente puede ser nitroetano, o dioxano. La base utilizada puede ser una carbonato metálico, un bicarbonato metálico o hidruro de sodio. Preferiblemente, utilizamos una sal carbonato, como K_2CO_3 o Na_2CO_3 . El avance de la reacción se sigue mediante TLC o HPLC y puede durar de una a varias horas, dependiendo de los sustituyentes, el solvente y la temperatura. Ventajosamente Z se selecciona de grupos alquilo (primario, terciario) o puede ser un grupo bencilo. Preferiblemente Z es etilo.

20 Cuando W es diferente de $-CO-NH-$, el experto adaptará fácilmente este método utilizando su conocimiento general. Por ejemplo, después de la protección de la oxima y la saponificación, la reducción con borano del ácido con el alcohol debería permitir la preparación de los aldehídos y a partir de éstos, mediante la reacción de Homer Wadsworth Emmons, el análogo insaturado ($W: CH=CH$).

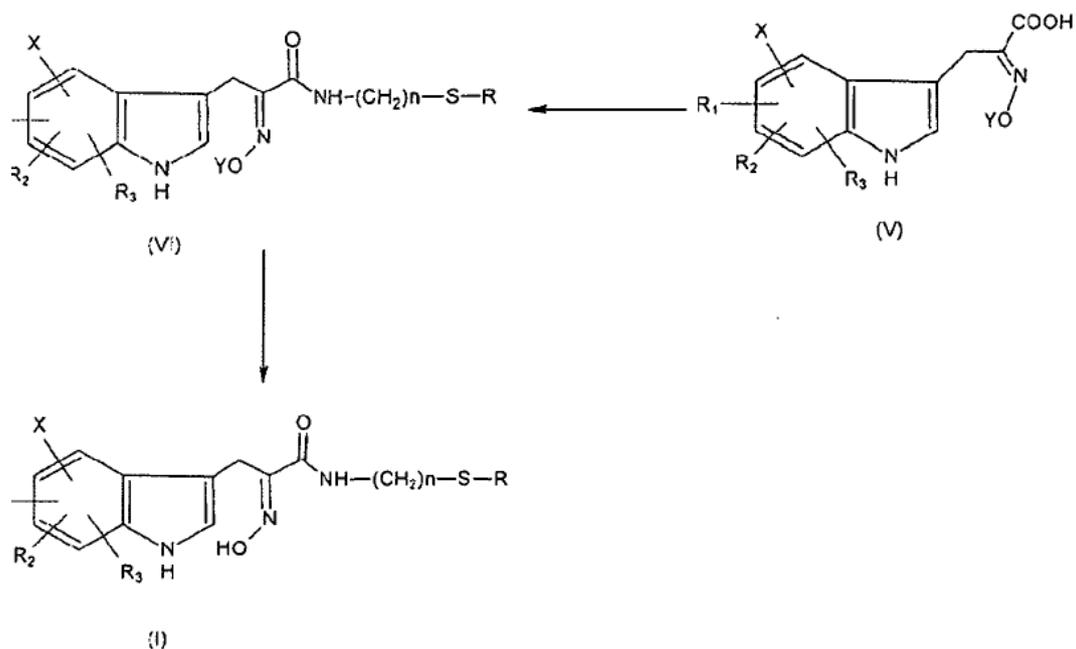
Ventajosamente, esta primera etapa se continúa mediante el proceso descrito en el Esquema 4:



Esquema 4

5 La oxima (III) se convierte a un compuesto (IV) mediante la protección de la función oxima con un grupo protector Y apropiado, que puede ser seleccionado de tritilo, bencilo, metilo metoxi, metoxi etoxi metilo, 2-tetrahidropiraniolo. Preferiblemente Y es un grupo tritilo. Luego la función éster -COOZ se desprotege para dar -COOH mediante un tratamiento apropiado para proporcionar la molécula (V). Esta molécula se hace reaccionar con la di-amina $H_2N-(CH_2)_n-S-S-(CH_2)_n-NH_2$ apropiada para proporcionar (VI), y la función oxima se libera entonces para producir la molécula de fórmula (I).

Cuando $i=j=1$ este método se adapta para producir las moléculas correspondientes de fórmula (I) de acuerdo con el esquema 5:



Esquema 5

El compuesto (VI) se hace reaccionar con la amina $H_2N-(CH_2)_n-S-R$ y la función oxima se desprotege para proporcionar (I).

Se investigaron los efectos biológicos de los derivados de la psammopline A en modelos de cáncer:

5 - Inducción de la detención del ciclo celular y apoptosis:

Las moléculas de la invención indujeron la inhibición de proliferación (Fig. 1a) y/o apoptosis (Fig. 1b) en línea celular de la leucemia mieloide aguda U937 (Fig. 1). También aumentan la expresión de inhibidores del ciclo celular $p21^{WAF1/CIP1}$, los cuales se sabe que son necesarios para las detenciones de G1 y G2 sostenida (Bunz, F. et al., Science 282, 1497-501 (1998)) (Fig. 1c).

10 La acción anti-proliferativa y apoptogénica de la psammopline A y sus dos derivados 5008 y 5010 fue confirmado también en la línea celular del cáncer sólido tal como células cancerosas de mama (ZR75.1) y células cancerosas de próstata (LnCap; los datos no se muestran; véase también Fig 6).

- UVI5008 es un inhibidor de HDAC poderoso:

Se observaron acetilación histona H3 de la histona (Fig. 1d) e inhibición de HDAC (Fig. 1e, carriles 6, 7).

15 - UVI5008 inhibe la metilación del ADN en la región promotora de los genes supresores del tumor p16 INK4a y RARβ2:

Para estudiar si UVI5008 tendría actividades adicionales se estudió la posible inhibición de la metilación del ADN de los promotores de genes supresores del tumor. Utilizando PCR específico de la metilación (MSP) se observó un significativo aumento de $RAR\beta 2$ no metilado (Fig. 2a). Al mismo tiempo, aumentó la cantidad de ADN no metilado del promotor $p16^{INK4a}$ (Fig. 2b). De acuerdo con la desmetilación del promotor $p16^{INK4a}$ la expresión del gen $p16^{INK4a}$ fue desilenciada mediante la exposición a las moléculas de la invención, y esta expresión fue comparable a la observada con la combinación de 5-desazacitidina con SAHA (Fig. 2c).

Finalmente, utilizando ensayos *in vitro* de metiltransferasa de ADN (DNMT) se confirmó que las moléculas de fórmula (I) son inhibidores de DNMT (Fig. 2d).

25

- UVI5008 altera el estado de acetilación de la cromatina en el locus TRAIL que codifica una apoptosis selectiva del tumor que induce pérdida del ligando:

5 DE manera notable, la exposición de células mieloides U937 a las moléculas de fórmula (I), conduce a una dramática acetilación rápida de H3K9 de la cromatina en el promotor *TRAIL* y con una cinética de retraso también en el primer intrón (Fig. 5a). Esta marca de "activación" de la cromatina se correlaciona con el aumento de la expresión tanto en los niveles de ARNm (Fig. 5b) como en la proteína (Fig. 5b), como se muestra por los ensayos de RT-PCR y ELISA, respectivamente.

- Estudios de relación actividad-estructura (SAR) de la actividad de HDAC:

10 Para iniciar un estudio SAR de las actividades del inhibidor de HDAC descritas anteriormente para UVI5008, se sintetizó una serie de derivados (figura 7). Las lecturas de actividad que fueron investigadas sistemáticamente fueron la detención del ciclo celular e inducción de p21^{WAF1/CIP1}, inducción de diferenciación y acetilación de las dianas (en este caso a-tubulina).

- Derivados de psammaplina inducen la apoptosis en blastos del paciente con AML:

15 El intrigante potencial anticáncer de algunos derivados de la psammaplina A, nos impulsó a probar su actividad en blastos de pacientes con AML *ex vivo*. Como se muestra en la Fig. 4, las moléculas de fórmula (I) indujeron la detención del ciclo celular y la apoptosis en los blastos, según se determina mediante los ensayos de activación de la caspasa 3 en 4 cultivos *ex vivo* independientes de diferentes pacientes (pacientes con AML #102, #108, #109, #116). Todos los derivados evaluados mostraron una actividad apoptótica en dos muestras diferentes de blastos del paciente.

20 PARTE EXPERIMENTAL:

I- FIGURAS:

25 **Figura 1:** a) Análisis del ciclo celular de células U937 tratadas durante 30 horas, con los compuestos indicados utilizados a 1 y 5mM; b) Ensayo apoptótico de la caspasa 3 de los compuestos indicados después de 24 horas del tratamiento en las células U937; c) niveles de acetilación de la tubulina y expresión de p21 a 6 y 16 horas después del tratamiento con los compuestos indicados; los niveles de expresión de la tubulina total se utilizaron para la igualdad de la carga; d) Acetilación de la Histona H3 y los niveles de expresión de la metilación de H3 K9 a 6 y 16 horas después del tratamiento con los compuestos indicados; los niveles de expresión de la tubulina total se utilizaron para la igualdad de la carga; e) niveles de expresión de la acetilación de la histona H3 K9, K14, K18 a 6 y 16 horas después del tratamiento con los compuestos indicados; los niveles de expresión de ERKs totales se utilizaron para la igualdad de la carga; f) ensayo enzimático HDAC1: IP-HDAC1 se incubó con los inhibidores indicados durante 24 horas; la actividad se determina como liberación de 3H-acetilo; g) ensayo enzimático de HDAC4: IP-HDAC4 se incubó con los inhibidores indicados para 24 horas; la actividad se determina como liberación de 3H-acetil.

35 **Figura 2:** a) PCR específico de la metilación para el gen *RAP80*, después de 16 y 24 horas del tratamiento con los compuestos indicados; b) PCR específico de la metilación del gen p16, después de 24 horas de los tratamientos indicados. Las muestras son representativas de duplicados reales; c) niveles de expresión de p16 en las células U937, después de 24 horas con los tratamientos indicados; d) ensayo *in vitro* enzimático de DNMT llevado a cabo con 1.5 y 50 mM de los compuestos indicados;

40 **Figura 3:** a) análisis del ciclo celular y apoptosis llevado a cabo en células U937 después de 24 horas con los compuestos indicados; los valores son la media de triplicados independientes; b) análisis de expresión de CD11c llevados a cabo en células U937 con los compuestos indicados; los valores son la media de duplicados independientes; c) niveles de acetilación de la tubulina y de expresión de p21 in células U937 después de 24 horas con los tratamientos indicados; se utilizaron los niveles de expresión de ERKs totales para la igualdad de la carga; d) acetilación de histona H3 bajo las condiciones indicadas en (c).

45 **Figura 4:** a) Análisis del ciclo celular y apoptosis llevados a cabo en muestras *ex vivo* de pacientes con AML identificado con números; b) Análisis de ciclo celular, niveles de apoptosis y acetilación de la histona H3 de células AML #116 después de 20 horas de los tratamientos indicados.

50 **Figura 5:** a) Análisis de los niveles de acetilación de la histona H3 sobre la región reguladora del promotor *TRAIL* y en el primer intrón del gen *TRAIL* llevados a cabo en Chip y qPCR en células U937 después de la evolución del tiempo indicado con UVI5008; el "NoAb" representa el control negativo; b) la expresión del ARNm de *TRAIL* después de los tiempos indicados de la incubación con UVI5008; los niveles de G6PDH han sido utilizados para la igualdad

de la carga; c) los niveles de expresión de la proteína de TRAIL determinados mediante el ensayo de ELISA en células U937 después de 24 horas de tratamiento con UVI5008.

5 **Figura 6:** Sensibilidad de las líneas celulares A375, DU145, HCT116 y MaTu para inhibidores de HDAC. Las células se incubaron en la presencia de SAHA, MS275 o UVI5008 (0.1 μ M, 0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M). (a) el crecimiento celular se determinó después de 48 horas utilizando la prueba MTT. Los resultados se muestran como porcentaje de supervivencia en comparación con el control y representan la media \pm SD de mediciones por triplicado. (a) El porcentaje de células apoptóticas a 48 horas del cultivo se determinó mediante la tinción de APO2.7. Los resultados representan la media \pm SD de las mediciones por triplicado.

Figura 7: Lista de moléculas evaluadas.

10 **Figura 8a:** Curvas de respuesta de la dosis de las líneas celulares de A-375 con SAHA, MS-275 y UVI 5008, cálculo de los valores de IC₅₀.

Figura 8b: Curvas de respuesta de la dosis de las líneas celulares HCT-116 con SAHA, MS-275 y UVI 5008, cálculo de los valores de IC₅₀.

15 **Figura 8c:** Curvas de respuesta de la dosis de las líneas celulares DU-145 con SAHA, MS-275 y UVI 5008, cálculo de los valores de IC₅₀.

Figura 9A: Perfil del peso del animal normalizado del injerto heterólogo de HCT-116.

Figura 9B: Perfil del peso del tumor normalizado del injerto heterólogo de HCT-116.

Figura 10A: fragmentación MS/MS de YQKSTELLIR

Figura 10B: identificación MS del H3K56ac

20 **Figura 11:** análisis proteómico de SILAC de un número seleccionado de modificaciones de la histona.

Figura 12: análisis Western blot A y B utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente K56 acetilado de H3.

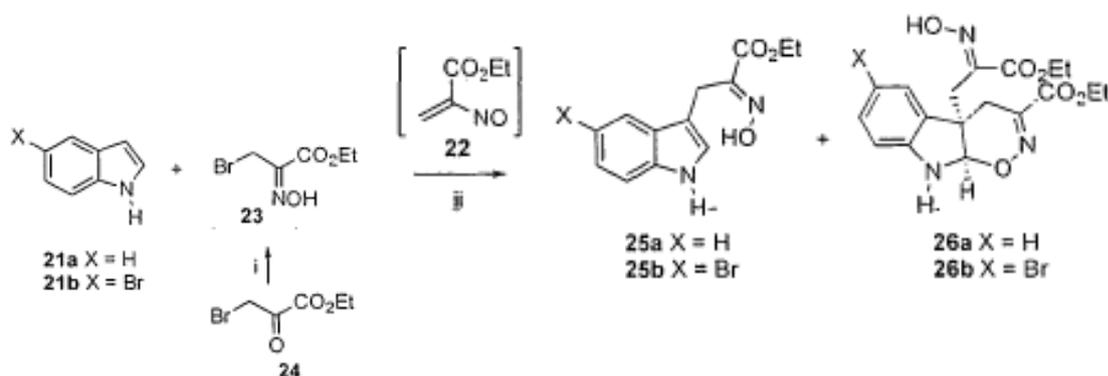
Figura 13A: % de actividad de SIRT1 y SIRT2 con controles, suramina de sodio, un inhibidor de sirtuina, y resveratrol, un activador de SIRT1, y con UVI5008 a concentraciones de 50mM y 5mM.

25 **Figura 13B:** Western blot de células MCF7 tratadas con etopósido solo o en la presencia de sirtinol (un conocido inhibidor de SIRT2) y con concentraciones de uvi5008 de 50mM y 5mM.

II- SÍNTESIS:

30 La síntesis (Esquema 6) inicia con la alquilación de indol **21** con el nitrosoacrilato **22**, (Gilchrist, T. L.; Roberts T. G. J. Chem. Soc. Perkin Trans I 1983, 1283-1292) generado *in situ* a partir de bromo-oxima **23**, preparado mediante la reacción de bromopiruvato de etilo **24** con clorhidrato de hidroxilamina. La alquilación proporciona también cicloaductos **26** resultantes de dos ataques consecutivos en la posición C3. Fueron separados por cromatografía de columna con sílica gel (AcOEt/hexano 40:60). Por lo tanto, la reacción tiene potencial como un método para la alquilación de indoles sustituidos en la posición 3. El rendimiento del producto de reacción **25** se aumentó a 67% después de la optimización (véase Tabla).

Esquema 6



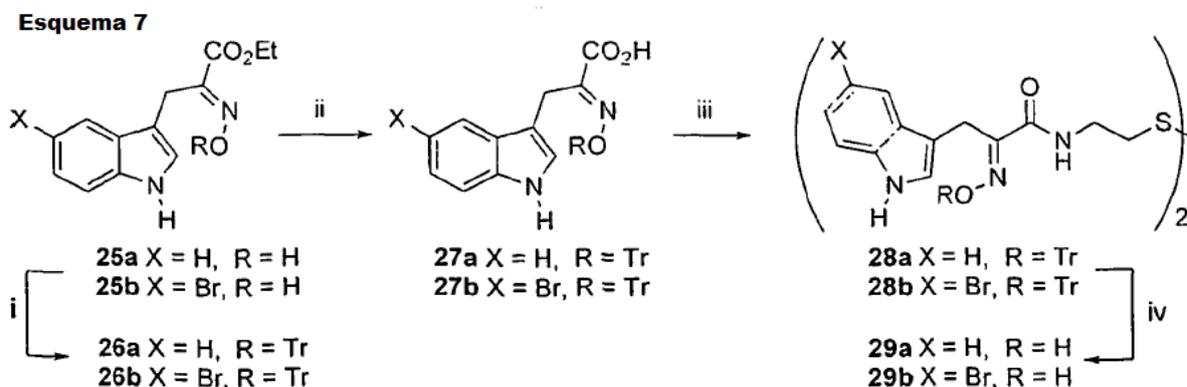
Esquema 6 Reactivos y condiciones: (i) **24**, CHCl_3 , $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}(1:1)$, 22h, 25 °C (86%). (ii) K_2CO_3 , CH_2Cl_2 , 25 °C, 20 h (ver Tabla 1).

5 Tabla 1 Estructuras de los compuestos **25a** y **26a** se confirmaron por cristalografía de rayos X

Entrada	23 (equiv.)	Indol (equiv.)	Na_2CO_3 (equiv.)	Rendimiento (%)
				21:23:25:26
1	1	21a (1)	0.4	17:11:40:4
2	1.75	21a (1)	0.4	0:0:47:16
3	1	21a (1)	5.5	0:0:47:22
4	2	21a (2)	5.5	nd:0:67:7
5	2	21 (2)	5.5	35:0:60:4

Los compuestos **25a** y **25b** fueron convertidos entonces a la oxima protegida **26** (Esquema 6) mediante la reacción con cloruro de tritilo, hidrolozados y acoplados con cistamina *vía* activación como el *N*-succinimidil éster (Nicolaou, K. C. et al., Chem.-Eur. J. 2001, 7, 4280-4295). La división del grupo tritilo protector entonces proporciona **29a** y **29b** con 43% y 50% de rendimiento durante las 4 etapas a partir de **25**.

10

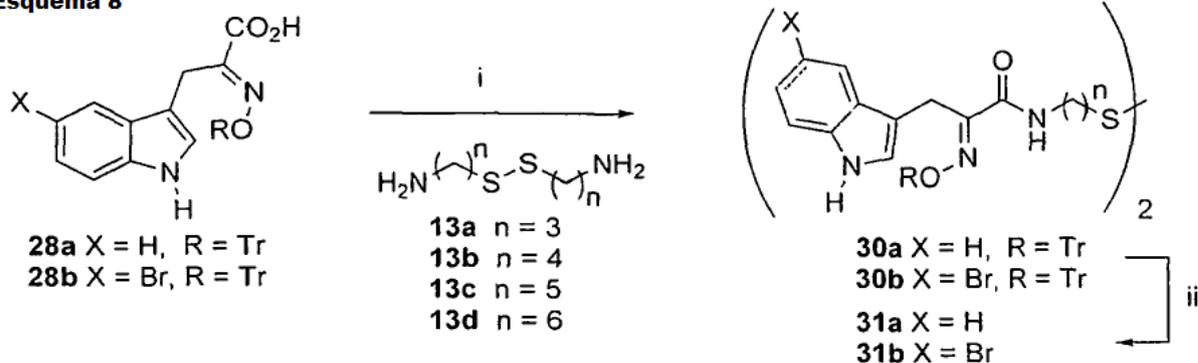


Esquema 7 Reactivos y condiciones: (i) K_2CO_3 , CH_2Cl_2 , TrCl , 25 °C, 20 h (97%, **26a**; 74%, **26b**). (ii) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1), 25 °C, 20h (90%, **27a**; 99%, **27b**). (iii) i. EDC, NHS, dioxano, 25 °C, 2 h. ii. Cistamina, Et_3N , MeOH , dioxano, 25 °C, 15 h (64%, **28a**; 84%, **28b**). (iv) HCl 2M en Et_2O , CH_2Cl_2 , 25 °C, 2 h (78%, **29a**; 81%, **29b**).

La protección con un grupo de carga no cambia la geometría *E* de la oxima **27** como se confirma por la estructura de rayos X.

Análogos con diferentes longitudes de cadena fueron sintetizados de la misma manera a lo largo del acoplamiento con las series de diaminas (Esquema 8).

Esquema 8



5

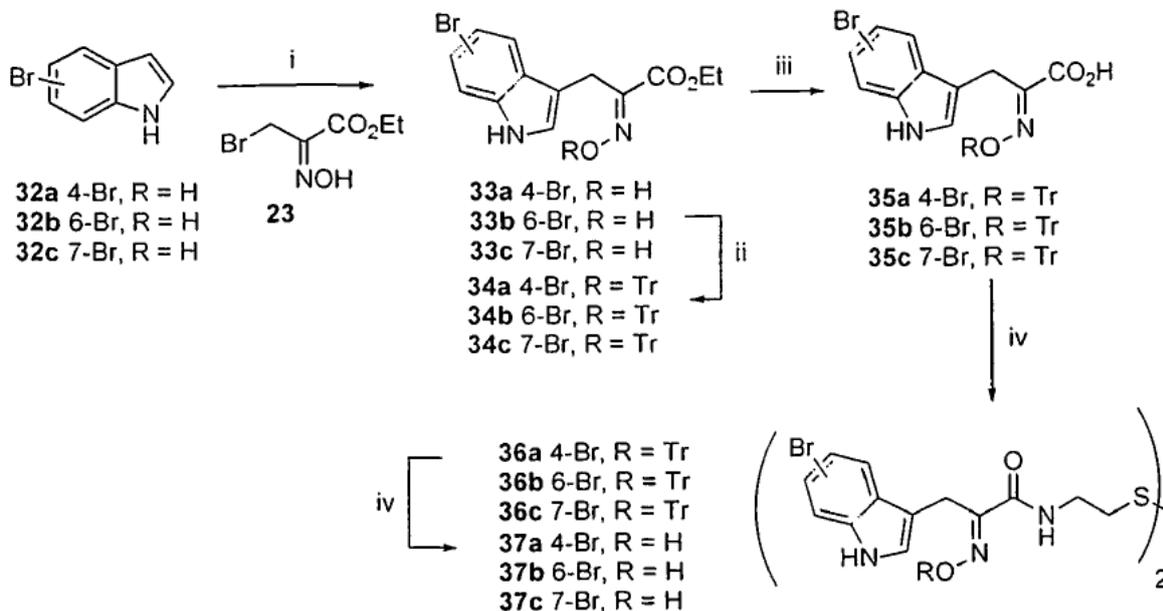
Esquema 8 *Reactivos y condiciones:* (i) i. EDC, NHS, dioxano, 25 °C, 2 h. ii. **13**, Et₃N, MeOH, dioxano, 25 °C, 15 h. (iv) HCl 2M en Et₂O, CH₂Cl₂, 25 °C, 2 h. Los rendimientos para cada etapa se recolectaron en la siguiente Tabla 2:

Tabla 2

Compuesto	Producción 30a	Producción 31a	Compuesto	Producción 30b	Producción 31b
X = H	(%)	(%)	X = Br	(%)	(%)
n = 3	54	70	n = 3	34	50
n = 4	-	-	n = 4	25	70
n = 5	41	-	n = 5	21	96
n = 6	38	70	n = 6	-	-

10 Esta metodología también fue explotada para la preparación de la serie total de isómeros de bromoindol. Estos bromoindoles fueron sintetizados por la aplicación de la metodología Leimgruber-Batcho (Moyer, M. P. et al., H. J. Org. Chem. 1986, 56, 5106-5110) o mediante el procedimiento de Bartoli (Nicolaou, K. C. et al., J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 12888-12896). Siguiendo las mismas etapas indicadas anteriormente, se obtuvo la serie de análogos de la psammaplina construida alrededor de los regioisómeros del bromoindol (Esquema 9).

Esquema 9

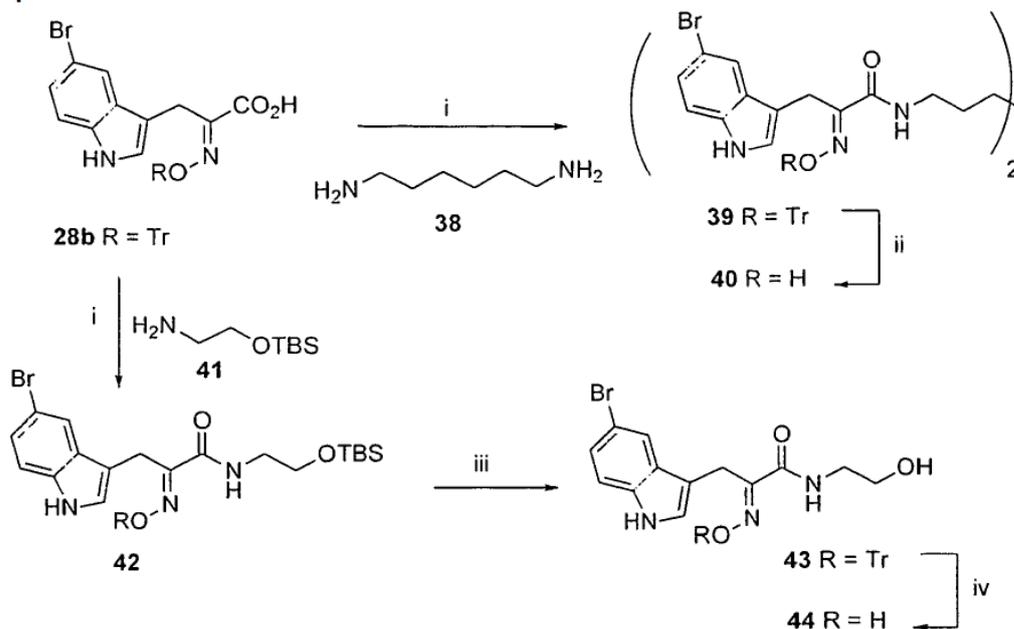


5

Esquema 9 Reactivos y condiciones: (i) **23**, K₂CO₃, CH₂Cl₂, 25 °C, 20 h (65%, **33a**; 43%, **33b**, 41%, **33c**). (ii) K₂CO₃, CH₂Cl₂, TrCl, 25 °C, 20 h (74%, **34a**; 51%, **34b**, 41%, **34c**). (iii) LiOH-H₂O, THF:H₂O (1:1), 25 °C, 20h (82%, **35a**; 97%, **35b**; 91%, **35c**). (iv) i. EDC, NHS, dioxano, 25 °C, 2 h. ii. Cistamina, Et₃N, MeOH, dioxano, 25 °C, 15 h (67%, **36a**; 77%, **36b**, 50%, **36c**). (v) HCl 2M en Et₂O, CH₂Cl₂, 25 °C, 2 h (81%, **37a**; 54%, **37b**; 60%, **37c**).

DE forma análoga, fueron sintetizados otros compuestos mediante el acoplamiento del ácido **28b** con aminas **38** y **41** (Esquema 10). Fue necesario utilizar TFA para la división del grupo tritilo en **39** (Glinka, T. et al., Bioorg. Med. Chem. 2003, 11, 591-600).

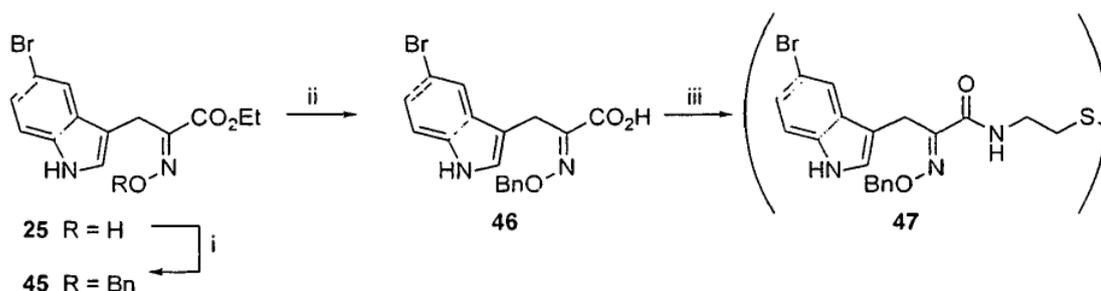
Esquema 10



10 **Esquema 10** Reactivos y condiciones: (i) i. EDC, NHS, dioxano, 25 °C, 2 h. ii. **38** o **41**, Et₃N, MeOH, dioxano, 25 °C, 15 h (74%, **39**; 63%, **42**). (ii) TFA, CH₂Cl₂, 0 °C a 25 °C, 1 h (50%). (iii) THF:HCO₂H:H₂O (7:2:1), 19 h, 25 °C (99%). (iv) HCl 2M en Et₂O, CH₂Cl₂, 25 °C, 2 h (59%).

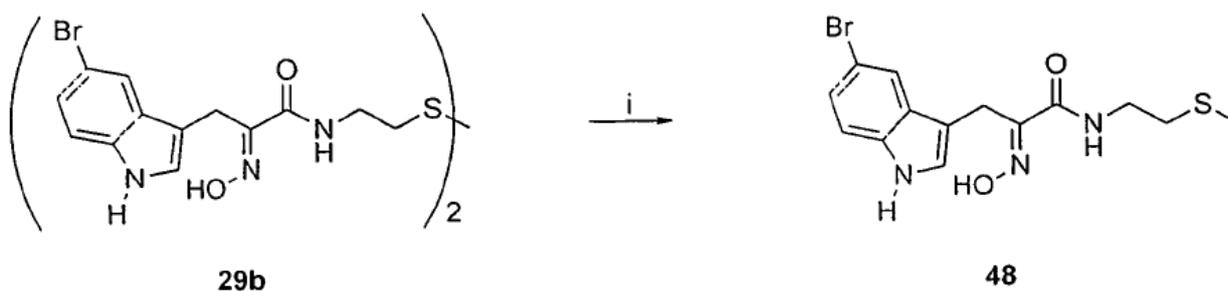
Otros compuestos sintetizados fueron la bencil oxima protegida (Rutger, R. P. et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans I 1987, 2473-2480) (Esquema 11) y el metil sulfuro por la reducción del disulfuro con NaBH₄ y metilación con MeI (Esquema 12) (Rutger, R. P. et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans I 1987, 2473-2480).

Esquema 11



- 5 **Esquema 11** Reactivos y condiciones: (i) BnBr, KOtBu, DME, 12 h, 25 °C (72%). (ii) LiOH-H₂O, THF:H₂O (1:1), 25 °C, 20h (99%). (iv) i. EDC, NHS, dioxano, 25 °C, 2 h. ii. Cistamina, Et₃N, MeOH, dioxano, 25 °C, 15 h (80%).

Esquema 12



Esquema 12. Reactivos y condiciones: (i) i. NaBH₄, NaOH, EtOH, 25 °C, 0.5 h. ii. MeI, 25 °C, 16 h, 25 °C (80%).

III- ACTIVIDAD BIOLÓGICA

10 A- MÉTODOS:

- Cultivo celular:

La línea celular de la leucemia humana U937 se propagó en medio RPMI suplementado con 10% de FBS (suero fetal bovino; Hyclone) y antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 250 ng/mL de anfotericina-B). Las células se conservaron a la concentración constante de 200000 células por mililitro de medio de cultivo. Para las muestras de AML, se purificó médula ósea que contenía 80% a 90% de blastos leucémicos sobre Ficoll. Este estudio fue aprobado por el Ethical Committee of the Second University of Naples.

- Ligandos y materiales:

SAHA (Alexis) se disolvió en DMSO y se utilizó a 5x10⁻⁶M. MS-275 (Schering AG) se disolvió en etanol y se utilizó a 5x10⁻⁶M; ácido valproico (VPA; Sigma) se utilizó a 1mM. Todos los demás compuestos descritos se disolvieron en DMSO (Sigma-Aldrich) y se utilizaron a 1 o 5 mM.

- Análisis del ciclo celular:

2.5 x 10⁵ de células se recolectaron y se volvieron a suspender en 500 µL de una solución reguladora hipotónica (0.1% de Triton X-100, 0.1% de citrato de sodio, 50 µg/mL de yoduro de propidio, ARNasa A). Las células se incubaron en la oscuridad durante 30 min. Las muestras fueron obtenidas en un citómetro de flujo FACS-Calibur utilizando el software Cell Quest (Becton Dickinson) y se analizaron con procedimientos estándar utilizando el

software Cell Quest (Becton Dickinson) y el Software ModFit LT versión 3 (Verity). Todos los experimentos se realizaron 3 veces.

- Análisis de Apoptosis FACS:

5 La apoptosis se midió con la detección de la actividad de la caspasa 3 (Puente B), según lo sugerido por los proveedores y se cuantificó por FACS (Becton Dickinson).

- Diferenciación Granulocítica:

10 La Diferenciación Granulocítica se llevó a cabo de la siguiente manera. En resumen, las células U937 se cultivaron y volvieron a suspender en 10µL de ficoeritrina-conjugada CD11c (CD11c-PE). Las muestras control se incubaron con 10µL de IgG1 de ratón PE conjugada, se incubaron durante 30 min a 4 °C en la oscuridad, se lavaron en PBS y se volvieron a suspender en 500 µL de PBS que contenía yoduro de propidio (0.25 mg/mL). Las muestras fueron analizadas por FACS con Cell Quest technology (Becton Dickinson). Las células positivas en yoduro de propidio (PI) fueron excluidas del análisis.

- Análisis Western Blot:

15 Los análisis Western Blot se llevaron a cabo de acuerdo con procedimientos estándar siguiendo las sugerencias de los proveedores de los anticuerpos. Para la determinación de p21^{WAF1/CIP1} y p16^{INK4}, se separaron 100 mg de extractos de proteína total en un gel al 15% de poliacrilamida y se transfirieron. Se mostraron Western blots para p21 (Transduction Laboratories, dilución 1:500), p16 (Santa Cruz) y se usaron ERKs totales (Santa Cruz) para normalizar la igualdad de la carga. Para la acetilación de alfa-tubulina se separaron 25 mg de extractos de proteína total en un gel al 10% de poliacrilamida y se transfirieron. Ee mostraron los Western blots para alfa-tubulina acetilada (Sigma, dilución 1:500) y se utilizaron ERKs totales (Santa Cruz) o tubulina total (Sigma) para normalizar la igualdad de la carga.

- Aislamiento de ADN genómico:

25 Las células se volvieron a suspender en 150µl de TE (Tris 10mM - EDTA 1mM). Se adicionaron 1,5 mL de solución reguladora de lisis (Tris 10mM pH 8,0 - EDTA 0,1mM pH 8,0 - 0,5% de SDS - 20µg/ml de ARNasa libre de ADNasa), y después de un tiempo de incubación de 1h a 37°C, se llevó a cabo una segunda incubación a 56°C con la proteinasa K a 100mg/ml de concentración final durante la noche. Las proteínas se eliminaron mediante extracción con fenol-cloroformo. El ADN genómico se precipitó entonces con 0.2 vol. de acetato de amonio 10M y 2 vol. de etanol, y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. La pella de ADN se lavó con 70% de etanol, se secó al ambiente y se volvió a suspender en agua libre de nucleasa a 4°C en placa con oscilación. La concentración se midió a 30 260nm.

- Digestión de ADN genómico:

40µg de ADN genómico fueron digeridos con 50 U EcoRV y PvuII (no se corta en el promotor RARβ2) durante la noche a 37°C. Las proteínas se eliminaron mediante extracción fenol-cloroformo, y el ADN se precipitó y resuspendió con 40 ml de agua filtrada.

35 - Metilación *In vitro* de ADN genómico:

20µg de ADN digerido fueron metilados con 8U de Sssl metilasa (New England Biolabs) en presencia de SAM 3,2 mM de concentración final durante 2 horas a 37°C. Después de la extracción con fenol-cloroformo, el ADN se precipitó y resuspendió con 20µl de agua filtrada.

- tratamiento con bisulfito y PCR para metilación de RARβ:

40 20µg de ADN genómico (o ADN metilado *in vitro*) se mezclaron con 5,5 µl de NaOH 3M, el volumen se ajustó a 55,5 µl con agua filtrada. Después de 15 min de incubación a 42°C, fueron adicionados 500µl de solución de bisulfito de sodio 3M que contenía hidroquinona 0,05M. La mezcla se incubó a 54°C durante 16 h. El ADN modificado fue purificado con el kit de purificación del extracto de Nucleospin y se eluyó en 50µl de agua filtrada. El eluato fue desulfonado con 5,5µl de NaOH 3M durante 15 min a temperatura ambiente. Se agregaron 16,8µl de acetato de amonio 10M, 1µl de *glycoblue* y se agregaron 200µl de etanol para la precipitación del ADN. El ADN se recuperó después de la centrifugación, se lavó, se secó al ambiente y se resuspendió con 50µl de agua filtrada. La PCR se realizó de la siguiente manera: 5 min para la desnaturalización a 94°C; 35 ciclos; 1min. desnaturalización a 94°C, 1 min. hibridación a 57.5°C para el cebador metilado y 52°C para el cebador no metilado, 1 min. de elongación a 72°C. 45 5 min más de elongación a 72°C. El producto de PCR (10ml + 5ml colorante de carga) se analizó en gel de agarosa al 1.5%. Cebador metilado de RARβ2 S: 5' TCG AGA ACG CGA GCG ATT CG; AS: 5' GAC CAA TCC AAC CGA 50

AAC GA; cebador no metilado de RAR β 2 S: 5'TTG AGA ATG TGA GTG ATT TG; AS: 5' AAC CAA TCC AAC CAA AAC AA

- Tratamiento con bisulfito y PCR para la metilación de p16:

5 La extracción de ADN se realizó como se describe a continuación. El tratamiento con bisulfito y PCR para la determinación de metilación de p16 se realizó como lo describen los proveedores (Chemicon).

- Ensayo de citotoxicidad MTT

10 Las células HCT-116, A-375 y DU-145 se sembraron a 8000 células por pozo, en placas de grado cultivo celular transparentes de 96 pozos (Corning). Las placas se mantuvieron en incubadora humidificada de CO₂ (5%) durante la noche, de tal manera que las células se fijaron en el fondo. La siguiente mañana se adicionaron los compuestos (SAHA, MS-275 y UVI 5008) a las concentraciones de 100, 300, 1000, 3000 y 10000 nM y las placas fueron mantenidas de nuevo en la incubadora de CO₂ al 5% durante 48 horas. Después de que se completaron las 48 horas de tratamiento, se retiraron de cada pozo los compuestos que contenían medio. Se disolvieron 0.5 mg/mL de MTT (Sigma) en medio y se adicionaron a cada pozo y las placas se incubaron por 2 horas. Las células viables dividieron el anillo de tetrazolio de MTT en un producto de reacción de formazan de color azul oscuro, mientras que las células muertas permanecieron incoloras. El medio que contenía MTT se retiró suavemente y se adicionó DMSO en cada pozo. Después de agitar, las placas se leyeron en absorbancia a 540 nm. Todos los resultados se expresan como la media de tres pozos. El porcentaje de citotoxicidad se midió para cada compuesto y se representa en términos de sus valores IC₅₀.

- Análisis de distribución celular activada por fluorescencia (FACS) por el anticuerpo monoclonal anti-APO2.7

20 La inducción de apoptosis TC se analizó por expresión de APO2.7 (7A6), que reacciona preferencialmente con una proteína de membrana mitocondrial de 38 kDa en las células que sufren apoptosis y fue establecida mediante el seguimiento de la viabilidad celular y respuesta apoptótica (Koester, S. K. et al., Cytometry 29, 306-12, 1997; Zhang, C., Ao, Z., Seth, A. & Schlossman, S. F., J Immunol 157, 3980-7, 1996). Las líneas celulares A375, DU145, HCT116 y MaTu se incubaron con SAHA (1, 3, 10 μ M), MS275 (1, 3, 10 μ M) o UVI5008 (1, 3, 10 μ M) durante 48 h. Después de la tripsinización, las células con o sin tratamiento se lavaron una vez en PBS. Las células se incubaron luego con PBS que contenía 2.5% de FCS y 100 μ g/ml de digitonina a 4°C. Después del lavado, las células se incubaron con mAb conjugado con ficoeritrina APO2.7 antihumano de ratón (Beckman Coulter). Las células se lavaron y se volvieron a suspender en PBS/2.5% de FCS y se analizaron por FACSsort (Becton Dickinson). Las células marcadas se analizaron para expresión de APO2.7 utilizando el software CellQuest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

- Actividad anti-tumor *In vivo* de UVI 5008:

Hemos verificado la actividad anti-tumor de este compuesto *in vivo* por xenoinjerto de células de carcinoma de colon HCT-116 en ratones inmunocompetentes.

Materiales y método:

35 SAHA, un inhibidor de pan HDAC fue un regalo de Merck, MS-275, un inhibidor de HDAC de clase I fue un regalo de Schering y el UVI 5008 fue sintetizado como se revela anteriormente. Todos los ratones en los estudios *in vivo* fueron ratones hembra Crl:Nu(Ico)-Foxnlnu desnudos atómicos (swiss) comprados de Charles River.

Preparación de las dosis:

40 Todos los compuestos se disolvieron en DMSO al 8% + 2.5% de Tween 80 + 89.5 % de Aceite. Junto con estas tres dosis también se ha tomado el vehículo control.

Diseño experimental:

45 4x10⁶ células de carcinoma de colon HCT-116 se inyectaron vía subcutánea en el flanco izquierdo de cada animal. Cuando los tumores crecieron hasta un tamaño de 4 mm, los animales fueron asignados al azar a los respectivos 4 grupos, de tal manera que cada grupo contenía animales de aproximadamente el mismo tamaño de tumor antes del tratamiento. Los fármacos fueron administrados a través de la ruta intra-peritoneal. Las primeras pruebas revelaron que SAHA a la dosis de 30mg/kg de ratones no fue tolerable para los ratones y se observó 60% de mortalidad. Por lo tanto, el estudio comparativo se llevó a cabo mediante la reducción de la dosis a 20 mg/kg. La UVI 5008 a 30 mg/kg fue bien tolerada y no se observó mortalidad en estudios tempranos; por lo tanto la dosis se aumentó a 40 mg/kg y se administró MS-275 a la dosis de 20 mg/kg como SAHA. El tratamiento fue administrado cada segundo día. Hubo 10 animales en cada grupo. El tamaño del tumor se determinó utilizando la determinación con el

Calibrador Vernier. El volumen del tumor se determinó utilizando la fórmula: $TV=(a^2 \times b)/2$ (en el cual a representa la anchura y b la longitud del tumor).

- Actividad del UVI5008 en SIRT1 y 2 humanos:

5 El ensayo de actividad SIRT se realizó utilizando SIRT1 y SIRT2 recombinantes humanos. Se incubaron SIRT1 (1 U/pozo) o SIRT2 (5 U/pozo), respectivamente, (37 °C durante 1 h) con el sustrato SIRT1/2 (correspondiente a un péptido acetilado p53) en la presencia de NAD⁺ y varias concentraciones de los compuestos evaluados (inhibidores o activadores de las sirtuinas). La actividad se midió como la intensidad de la fluorescencia. Como controles internos, se incluyeron suramina de sodio, un inhibidor de sirtuina, y resveratrol, un activador de SIRT1. La fluorescencia se midió en un lector fluorométrico (Inphinite 200 TECAN) con la excitación fijada a 360 nm y la
10 detección de la emisión ajustada a 460 nm

- Actividad del UVI5008 en la acetilación de p53:

15 Las células MCF7 (células cancerosas de mama humanas) han sido cultivadas siguiendo el procedimiento estándar y han sido tratadas durante 6 horas con los compuestos indicados en presencia de Etoposide 25 µM. Los extractos de proteína total han sido corridos sobre gel SDS y luego se transfirieron. SE llevó a cabo Western Blot utilizando el anti p53 arc382 (Abcam) siguiendo los procedimientos estándar. Se utilizaron ERKs (Santa Cruz) para la igualdad de la carga de control.

- Estudio de modificaciones post-traducción en proteínas de histona por tratamiento de las células con el UVI5008:

20 Las células U937 se cultivaron en medio RPMI en la presencia de lisina y arginina ("ligera") o versiones isotópicas, Arg10 y Lys8 ("pesada"). Las células cultivadas en medio ligero fueron tratadas durante 24h con UVI5008 o SAHA a una concentración final de 5mM. Como controles, se trataron células cultivadas en medio pesado durante 24h con DMSO. Las células ligeras y pesadas fueron 7.5×10^6 células recolectadas y mezcladas en relación 1:1 (total 15×10^6 células). Las células se lavaron dos veces con PBS y la pella de células se almacenó a -80°C.

- Extracción con histona

25 Las células fueron resuspendidas en 750µl de Solución reguladora de Extracción Triton (TEB: PBS que contenía 0.5% de Triton X 100 (v/v), 2mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) y 0.02% (peso/v) de NaN₃) y se sometieron a lisis sobre hielo durante 10 min con agitación suave. El lisado fue centrifugado durante 10 min a 6000 rpm y el sobrenadante se descartó. La pella se lavó con 375µl de TEB y se pelletizó por centrifugación como antes. La pella se volvió a suspender en 20µl de HCl 250mM y la extracción ácida de las histonas se realizó o/n a 4°C.

- Espectrometría de masas

30 Las histonas extraídas fueron clarificadas por centrifugación y se separaron en un gel 15% de acrilamida y el gel fue teñido con Coomassie. La región del gel que contenía las histonas fue dividida, reducida y alquilada en el gel. Las proteínas fueron digeridas o/n con tripsina (Promega). Los péptidos fueron eluidos a partir del gel con ácido trifluoroacético. 8ml de un total de 20ml fueron secuenciados utilizando el sistema de nanoflujo Agilent 1100 de
35 cromatografía líquida de nano alta presión conectado en línea a un espectrómetro de masas cuadrupolo lineal de trampa de iones con transformadas de Fourier 7-Tesla (FT) (Thermo Electron, Bremen, Alemania). Los péptidos fueron eluidos a partir de la columna C18 mediante la aplicación de un gradiente de 30 minutos, mediante el cual la solución reguladora B se incrementa de 3% a 40% con un flujo de 30 ml/min. El algoritmo Mascot fue utilizado para identificar los péptidos/proteínas.

40 - Criterios de Búsqueda Mascot:

Búsqueda de iones por MS/MS

Enzima: Tripsina

Modificaciones fijas: Carbamidometil (C)

45 Modificaciones variables: Acetil (K), Arg pesada 6C13 4N154 (R), di-Metilación (K), di-Metilación (R), GlyGly (ubiquitinación) (K), Lys +8 6C13 2N15 (K), Metil (K), Metil (R), Oxidación (M)

Valores de masa: Monoisotópicos

Masa de la Proteína: Sin restricciones

Tolerancia de Masas del Péptido: ± 10 ppm

Tolerancia de Masa del Fragmento: ± 0.8 Da

Escisiones perdidas Máximas: 3

5 Tipo de instrumento: ESI-TRAP

Las células U937 fueron tratadas con UVI5008 durante 24 horas y las histonas fueron extraídas con ácido. Las proteínas fueron digeridas con tripsina y los péptidos fueron analizados utilizando un nano-LC que estaba en línea con un espectrómetro de masas FT-ICR. Los péptidos fueron identificados sobre la base de su masa de ión madre y las de los patrones de fragmentación utilizando Mascot. Las masas de los iones b- o y- se enumeran en la tabla (figura 10b). Las masas indicadas en caracteres en negrita corresponden con alta exactitud de masa para los fragmentos previstos del péptido YQKSTELLIP.

- Análisis Western blot:

El análisis se realizó utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente K56 acetilado. A). Cantidades iguales de histonas extraídas a partir de células U937 (carriles 1 y 3 en la figura 12 A) y las células U2OS (carriles 2 y 4 en la figura 12A) tratadas con solvente DMSO (carriles 1 y 2) o con UVI 5008 (carriles 3 y 4) durante 24 horas fueron cargadas en un gel SDS. La punta de flecha indica la posición de la histona H3. B). El tratamiento de células U937 con solvente (-en la figura 12B) o con UVI 5008 (+ en la figura 12B) se hizo durante 5 minutos, 30 minutos o 1, 2, 3 o 4 horas. La misma transferencia se desarrolló con un anticuerpo de núcleo de histona H3, se purificó y se volvió a probar con el anticuerpo específico acetilado.

20 **B- RESULTADOS:**

- Ensayo de citotoxicidad MTT:

El porcentaje de citotoxicidad se representa en términos de sus valores IC_{50} en la tabla 3 en este documento a continuación.

25 Tabla 3: valores IC_{50} de SAHA, MS-275 y UVI5008 en tres diferentes líneas celulares del cáncer utilizando ensayo de citotoxicidad de MTT

Valores IC_{50} en μM			
	SAHA	MS-275	UVI 5008
A-375	3,1 \pm 0,7	2,4 \pm 0,7	3,1 \pm 0,5
HCT-116	3,1 \pm 0,5	2,3 \pm 0,3	1,8 \pm 0,1
DU-145	3,2 \pm 0,5	8,2 \pm 0,6	2,4 \pm 0,3

- Inducción de la detención del ciclo celular y la apoptosis:

La psammaplina (UVI5000) y los derivados (UVI5004, UVI5008, UVI5010) de ésta (figura 7) indujeron la inhibición de proliferación (Fig. 1a) y/o apoptosis (Fig. 1b) en la línea celular de la leucemia mieloide aguda U937 (Fig. 1). Estos compuestos indujeron a la detención de ciclo celular que variaba desde bloques en el G1 (UVI5010 a 1mM) hasta detenciones en las fases S y G2 (UVI5000, UVI 5004, UVI5008). De forma notable, existe un cambio dependiente de la dosis característico en la posición del bloque dentro del ciclo celular para algunos compuestos, tales como UVI5010, el cual bloquea G1 a 1mM y detiene las células en G2-M a 5mM (Fig. 1a). UVI5008 es particular puesto que detiene las células en G2-M ya a 1mM. Estos datos sugieren que estos compuestos UVI afectan varios puntos de control del ciclo celular con distintas eficacias. En línea con los efectos del ciclo celular la expresión de los inhibidores del ciclo celular p21WAF1/CIP1, conocida por ser necesaria para detener G1 y G2 sostenido (Bunz, F. et al., Science 282, 1497-501 (1998)), se aumenta dramáticamente como se muestra para UVI5000, UVI5008 y UVI5010 (Fig. 1c).

Además de afectar la progresión del ciclo celular los compuestos UVI indujeron la apoptosis, aunque de forma muy diferente. Curiosamente, aquellos compuestos que tienen el efecto más pronunciado en la detención de G2-M ejercen también el efecto apoptogénico más fuerte (UVI5000, UVI5008, UVI5010 en Fig. 1b).

5 La acción anti-proliferativa y apoptogénica de psammaplina A y sus dos derivados 5008 y 5010 fue confirmada también en líneas celulares de cáncer sólido, tales como células cancerosas de mama (ZR75.1) y células de próstata cancerosas (LnCap; los datos no se muestran; véase también Fig 6).

- UVI5008 es un poderoso inhibidor de HDAC:

10 La psammaplina (UVI5000) se conoce como un inhibidor débil de la histona desacetilasa y la exposición de las células U937 a UVI5000 conduce a un aumento moderado dependiente del tiempo de acetilación de la histona H3 (Fig. 1d, carriles 2, 3). Esta actividad se mejora dramáticamente con UVI5008 (Fig. 1d, carriles 4, 5), mientras que UVI5010 no afecta significativamente la acetilación global de H3 (Fig. 1d, carriles 6, 7). La acetilación de la histona específica se afecta de manera similar que la acetilación global de H3, puesto que las acetilaciones H3K9, H3K14 y H3K18 todas se aumentaron en presencia de UVI5008 (Fig. 1e, carriles 4, 5) y en menor medida por el compuesto original UVI5000 (Fig. 1e, carriles 2, 3). Curiosamente, a pesar de que UVI5010 no afecta sensiblemente la acetilación global de la histona H3, este compuesto actúa como inhibidor de HDAC, ya que mejora H3h18 y en menor medida la acetilación de H3K14 (Fig. 1e, carriles 6, 7).

15 La metilación de H3K9 se correlaciona inversamente con la acetilación, la cual por lo general se considera una modificación de la "activación de la transcripción" en los promotores mientras que la metilación es una modificación de "silenciamiento". De acuerdo con esto, la metilación de H3K9 se disminuyó mediante la exposición a UVI5008 (Fig. 1d panel central; compárense el carril 1 con los carriles 4 y 5).

20 UVI5008 y su compuesto original UVI5000 mostraron la actividad inhibidora de HDAC también en ensayos *in vitro*. En efecto, mientras que UVI5000 es solo un débil inhibidor de HDAC1, UVI5008 bloquea la actividad de HDAC1 casi cuantitativamente y sobre todo más eficientemente que el inhibidor selectivo de clase I establecido de HDAC MS275 (Fig. 1f) que actualmente está entrando en la fase II de ensayos clínicos. Por otra parte, también la actividad de la desacetilasa HDAC4, un miembro de HDACs de la clase II, es casi completamente bloqueado por UVI5008 mientras que UVI5000 muestra solo actividad moderada (Fig. 1g). De acuerdo con esta observación UVI5008 (así como UVI5000 y UVI5010) inhibió la actividad de HDAC6, otra HDAC de clase II cuyo sustrato es la alfa tubulina (Fig. 1c, panel central, compárense carril 1 con los carriles 2-7; téngase en cuenta la cantidad de alfa tubulina total en el panel inferior para la comparación). Juntos, estos datos revelan que UVI5008 actúa como un inhibidor de pan-HDAC el cual bloquea ambas actividades de HDAC de clase I y de clase II. Es importante destacar que, UVI5008 es más activo en este ensayo que SAHA (vorinostat, Zolinza®), la cual ha sido aprobada para el tratamiento de linfoma de células T cutáneas y está en ensayos clínicos para otras indicaciones.

25 - UVI5008 inhibe la metilación del ADN en la región promotora de los genes supresores del tumor p16INK4a y RARβ2:

35 Para estudiar si UVI5008 tendría actividades adicionales, se estudió la posible inhibición de la metilación del ADN de los promotores de genes supresores del tumor. Se sabe que el promotor de *RARβ2* es silenciado por la metilación de islas de CpG en su promotor. Utilizando PCR específico de la metilación (MSP) se observó un significativo aumento de *RARβ2* no metilado con UVI5008 (Fig. 2a). De forma similar, MSP reveló una disminución de la metilación de la isla CpG en el promotor *p16^{INK4a}*, otro gen supresor de tumores bien establecido y regulador del ciclo celular. Al mismo tiempo, la cantidad de ADN del promotor *p16^{INK4a}* no metilado aumentó mediante el tratamiento con UVI5008 (Fig. 2b). En este caso, también UVI5000 muestra una actividad similar. De manera notable, la metiltransferasa del ADN clásica del inhibidor de ADN 5-azacitidina ("AZA") mostró una actividad que fue muy similar a la observada con UVI5008, mientras que SAHA fue inactiva (Fig. 2b). De acuerdo con la desmetilación del promotor *p16^{INK4a}* la expresión del gen de *pp16^{INK4a}* fue desilenciada mediante la exposición a UVI 5008, en menor medida también por UVI5000 y UVI5010, y esta expresión fue comparable a la observada con la combinación de 5-desazacitidina con SAHA (Fig. 2c).

40 Finalmente, utilizando ensayos *in vitro* de ADN metiltransferasa de ADN (DNMT) se confirmó que UVI5008 es un inhibidor de DNMT que es casi tan activo como RG108 aunque a concentraciones superiores (Fig. 2d).

45 - UVI5008 altera el estado de la acetilación de cromatina en el locus TRAIL que codifica una apoptosis selectiva del tumor que induce pérdida de ligando:

Nuestro trabajo previo ha revelado que los inhibidores de HDAC tales como MS275 inducen la expresión de la apoptosis relacionada con TNF que induce el ligando TRAIL (también llamado Apo2L o TNFSF10) en líneas celulares hematopoyéticas y blastos de pacientes (Insinga, A. et al., Nat Med 11, 71-6 (2005); Nebbioso, A. et al., Nat Med 11, 77-84 (2005)). De manera notable, la exposición de UVI5008 de las células U937 mieloides conduce a

una rápida dramática acetilación de H3K9 de la cromatina en el promotor *TRAIL* y con una cinética de retraso también en el primer intrón (Fig. 5a). Esta "activación" de marca de la cromatina se correlaciona con el aumento de expresión tanto de los niveles de ARNm (Fig. 5b) y de proteína (Fig. 5b), como se muestra mediante ensayos de RT-PCR y de ELISA, respectivamente.

5 - Estudios de relación actividad-estructura (SAR) de la actividad de HDAC:

Para iniciar un estudio SAR de las actividades del inhibidor de HDAC descritas anteriormente de UVI5008 se sintetizó una serie de derivados (Tabla 1). Las lecturas de actividad que fueron investigadas sistemáticamente fueron la detención de ciclo celular y la inducción de p21^{WAF1/CIP1}, la inducción de diferenciación y acetilación de dianas (en este caso α -tubulina). El objetivo era entender el papel de elementos estructurales particulares y sustituciones particulares, en particular ya sea (i) una o ambas unidades de las moléculas simétricas son necesarias para la actividad biológica, (ii) el puente disulfuro es prescindible o no, y (iii) finalmente si un compuesto no-divisible debería ejecutar cualquier acción.

- Posición de sustitución con bromo: UVI5008 tiene el Br unido al C5 del anillo indol. El cambio de la sustitución de C5 a C6 (UVI5013) tuvo solo un efecto menor en la detención del ciclo celular y la apoptosis (Fig. 3a), y más bien aumentó la inducción de diferenciación, determinada mediante la expresión del marcador CD11c (Fig. 3b). Como se esperaba p21^{WAF1/CIP1} de manera similar se indujo como para UVI5008, mientras que la inhibición de HDAC6, según se determinó por acetilación de α tubulina, se redujo ligeramente (Fig. 3c carril 9). La sustitución de Br en C7 (UVI5014) redujo levemente la detención del ciclo celular y la apoptosis pero los niveles de inducción de p21^{WAF1/CIP1} y la acetilación de α tubulina fueron muy similares a la observada con UVI5008 (Fig. 3a, b; Fig. 3c carril 12). La colocación del átomo de bromo en C4 redujo considerablemente la actividad (UVI 5012).

- Oxima: La función oxima es necesaria para la actividad, pues los derivados de trifenil metil (tritol) (UVI5018) y bencil (UVI5017) son inactivos en todos los ensayos mostrados en la Fig. 3a, b y Fig 3c (carriles 13, 14).

- Puente disulfuro: La presencia de un puente disulfuro es esencial para la actividad, pues el reemplazo del azufre por carbono (UVI5019) da como resultado en una molécula inactiva (Fig. 3a, b y Fig 3c carriles 15). Lo mismo es verdadero para un análogo correspondiente de UVI5000 (La psammaplina), como UVI5022, un producto de sustitución S \rightarrow C, es inactivo en todos los ensayos mostrados en la Fig. 3a, b y Fig. 3c (carril 18). Así la presencia de uno o dos átomos de azufre, y/o el puente disulfuro y/o la escisión de UVI5000 y UVI5008 activos son necesarios para la detención de, inducción y diferenciación de la apoptosis ciclo celular.

- Homólogos monoméricos: UVI5008 y todos los derivados activos son moléculas divisibles dimericas, que generan los correspondientes tioles por reducción. Este tiol es necesario para la actividad, pues el derivado hidroxilo UVI5021 es inactivo (Fig. 3a, b y Fig 3c carriles 17). La misma observación se hizo para UVI5023, el derivado hidroxilo de UVI5000 (Fig. 3a, b y Fig 3c carriles 19). Curiosamente sin embargo, el metiltioéster UVI5020 es inactivo en todos los ensayos y detención de G2M pero induce una detención de G1 y la correspondiente expresión mejorada de p21^{WAF1/CIP1} (Fig. 3a, b y Fig 3c carriles 16).

35 - Derivados de psammaplina inducen la apoptosis en blastos del paciente con AML:

El intrigante potencial anticáncer de algunos derivados de la psammaplina A nos llevó a poner en prueba su actividad *ex vivo* en blastos del paciente con AML. Como se muestra en la Fig. 4, ambas psammaplinas A (UVI5000) y UVI5008 indujeron la detención del ciclo celular y apoptosis en los blastos, según se determina por ensayos de activación de la caspasa 3 en 4 cultivos *ex vivo* independientes de diferentes pacientes (pacientes con AML #103, #108, #109, #116). Se debe notar que el bien conocido HDACi's tal como MS275 y SAHA muestra similares actividades para UVI5008. Para verificar la acción en blastos *ex vivo* del paciente con AML de los derivados fabricados de forma secundaria, probamos la actividad de los compuestos UVI5008, UVI5013, UVI5014 y UVI5020 a la concentración de 5mM. Como se muestra en la Figura 4, todos los derivados probados mostraron una actividad apoptótica en dos diferentes muestras de blastos del paciente. Téngase en cuenta que UVI5020 mostró solo una débil inducción de apoptosis en consonancia con el perfil de actividad alterada descrito anteriormente.

- Actividad anti-proliferativa en las líneas celulares del cáncer A-375, DU145 y HCT-116:

Las curvas de respuesta de la dosis con UVI5008 revelaron una potente actividad anti-proliferativa en diferentes tipos de líneas celulares del cáncer con valores IC₅₀ que oscilan entre 1.5 a 3 mM (Fig 8a-c).

- actividad anti-tumor *in vivo* de UVI 5008:

Los resultados se ilustran en la figura 9A y 9B. Todos los compuestos fueron utilizados a su máxima dosis tolerada. No hubo mortalidad en ninguno de los grupos de tratamiento. Hubo algunos signos de toxicidad en el grupo de tratamiento con UVI5008 en 3 animales de los 10 en la forma de acumulación de fluido intraperitoneal debido a que

su peso era mayor en comparación con otros animales. No se observaron otros síntomas de toxicidad. Concluimos de este experimento que UVI5008 mostraba una mayor actividad anti-tumoral en relación con SAHA y MS-275 en su MTD y ninguno de los compuestos causó pérdida de peso del animal. El perfil de peso del tumor normalizado se da en la tabla 4:

5 Tabla 4 Porcentaje de Inhibición del Crecimiento se proporciona en la tabla 5 en este documento a continuación:

Perfil de peso del tumor normalizado en mg (media de n=10)					
Días	1	4	12	17	22
Vehículo control	100 ± 21,7	231,71 ± 80,7	1305,14 ± 321,7	2689,1 ± 578,2	3701,3 ± 695,5
SAHA 20 mg/kg	100 ± 24	166,69 ± 56,8	892,95 ± 267,6	1915,59 ± 409,5	2952,8 ± 636,4
MS-275 20 mg/kg	100 ± 25	202,6 ± 81,5	746,65 ± 185	1360,61 ± 288	2423,09 ± 445,5
UVI 5008 40 mg/kg	100 ± 21,5	180,55 ± 43	548,73 ± 109,8	915,28 ± 196,8	1684,79 ± 262,1

Tabla 5: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento después de 22 días

SAHA 20 mg/kg	21 ± 17
MS-275 20 mg/kg	35 ± 12
UVI 5008 40mg/kg	56 ± 7

- Estudio de modificaciones post-traducción en las proteínas de histona por tratamiento de las células con UVI5008:

10 Se realizó un extenso análisis por espectrometría de masas para identificar las modificaciones post-traducción en las proteínas de histona que fueron inducidas o eliminadas en el tratamiento de las células con UVI5008. La alta precisión del espectrómetro de masas FT-ICR nos permitió determinar las diferentes modificaciones post-traducción de las histonas incluyendo la identificación inequívoca de péptido acetilado. El tratamiento de células U937 (y otras) con UVI5008 dio como resultado el cambio de la abundancia relativa del péptido acetilado (estudio SILAC) así como la identificación de un novedoso residuo de lisina acetilado en histona H3, H3K56 (Figura 10a). Hasta ahora, la acetilación de H3K56 fue detectada únicamente por nosotros y otros en eucariotes inferiores [Ozdemir A, Spicuglia S, Lasonder E, Vermeulen M, Campsteijn C, Stunnenberg HG, Logie C., Characterization of lysine 56 of histone H3 as an acetylation site in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 2005 Jul 15; 280(28):25949-52. Epub 2005 May 10] y revisada en [Ozdemir A, Masumoto H, Fitzjohn P, Verreault A, Logie C. Histone H3 lysine 56 acetylation: a new twist in the chromosome cycle Cell Cycle. 2006 Nov;5(22):2602-8. Epub 2006 Nov 15]. Estudios en levaduras han revelado que esta modificación ocurre en prácticamente todas las histonas sintetizadas recientemente que se depositan en la cromatina durante la fase-S en las levaduras. La eliminación de la acetilación K56 tiene lugar en la fase G2/M del ciclo celular y es dependiente de Hst3 y Hst4, dos proteínas que se relacionan con la NAD⁺-histona desacetilasa dependiente Sir2. Sobre la base de los datos de las levaduras, se probó si Sir1 y/o -2 humano puede ser inhibido por UVI5008 *in vitro* y si la acetilación de un conocido sustrato Sir2, llamado p53, se aumentaba después del tratamiento con UVI5008 *in vivo*.

- Actividad de UVI5008 sobre SIRT1 y 2 humano:

30 Los resultados se ilustran en la figura 13A. La actividad de UVI5008 ha sido probada a 2 diferentes concentraciones en SIRT1 y 2 humanos. Como controles hemos utilizado activadores e inhibidores conocidos tales como resveratrol y suramina (A). Como se demostró claramente UVI5008 mostró claramente capacidad contra ambos. Hemos calculado los valores de IC₅₀ de UVI5008 como 8.9 mM en SIRT1 y 7.8 mM en SIRT2. Estos datos demostraron claramente que UVI5008 es un buen inhibidor de SIRT1 y SIRT2. Algunas de las actividades anticáncer también pueden deberse de este modo a esta acción como se reporta para otros inhibidores de SIRT en las células cancerosas.

35

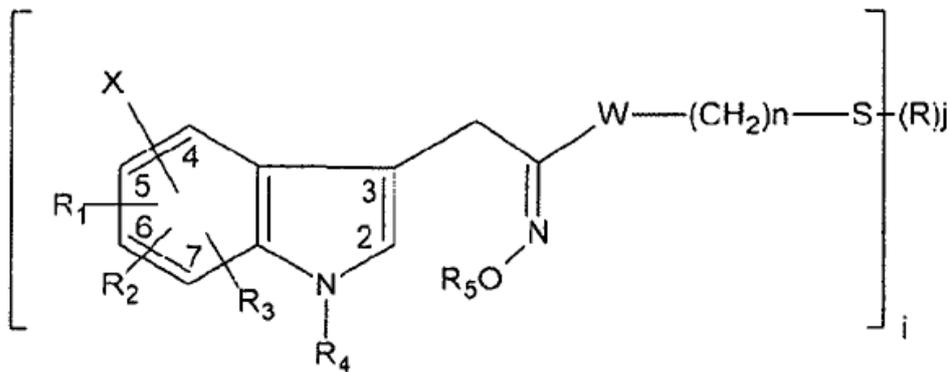
- Actividad del UVI5008 sobre la acetilación de p53:

La Figura 13B ilustra los efectos de UVI5008 sobre los niveles de acetilación de p53, tomados como lectura de la inhibición de SIRT. Este experimento se ha llevado a cabo en células MCF7 las cuales son p53 WT en cotratamiento con Etoposide 25mM para inducir las alteraciones de ADN y activar p53. Podríamos confirmar la acción de hiperacetilación de UVI5008 en el p53.

5

REIVINDICACIONES

1. Molécula de fórmula (I):



(I)

5 donde:

n es un número entero seleccionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8;

i es un número entero seleccionado de 1, 2;

j es un número entero seleccionado de 0,1;

cuando i = 2, entonces j = 0 y cuando i = 1, entonces j = 1;

10 X es un átomo de halógeno;

W es un grupo de unión seleccionado de: -CO-NH-, -NH-CO-, -CO-O-, -O-CO-, -CO-S-, -S-CO-, -CH=CH-, en enlace covalente;

R es un grupo seleccionado de: un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo carboxialquilo C₁-C₆;

15 R₁, R₂, R₃, idénticos o diferentes se seleccionan de: un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo haloalquilo C₁-C₆, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁-C₆, un grupo aminoalquilo C₁-C₆, un grupo heterocicloalquilo saturado C₁-C₆, un grupo arilo C₆-C₁₂, un grupo aralquilo C₆-C₁₂, un grupo heteroarilo C₄-C₁₂;

R₄ se selecciona de: un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo acilo C₂-C₆, un grupo arilo C₆-C₁₂, un grupo aralquilo C₆-C₂₀, un grupo heteroarilo C₄-C₁₂;

R₅ se selecciona de: un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo aralquilo C₆-C₂₀;

20 y sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. Una molécula según la reivindicación 1, donde n es un número entero seleccionado de 2, 3, 4, 5, 6.

3. Una molécula según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde i es 2.

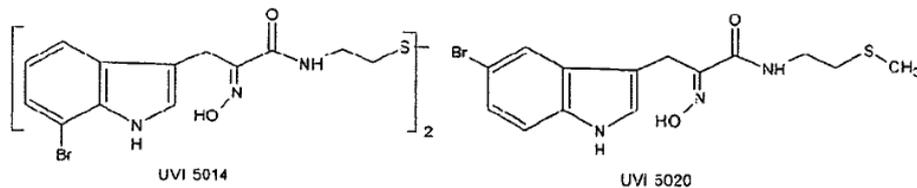
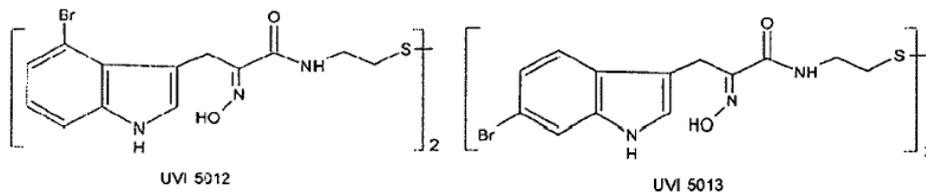
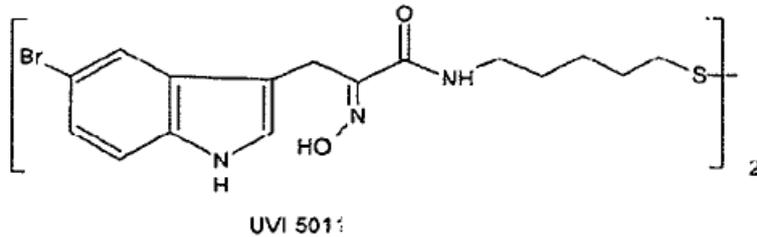
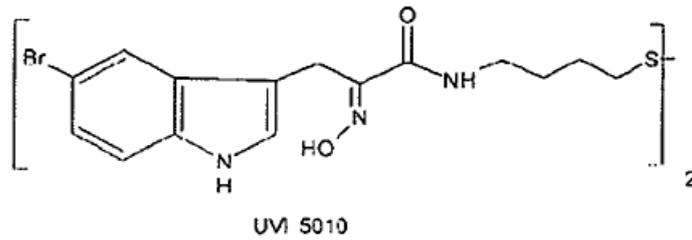
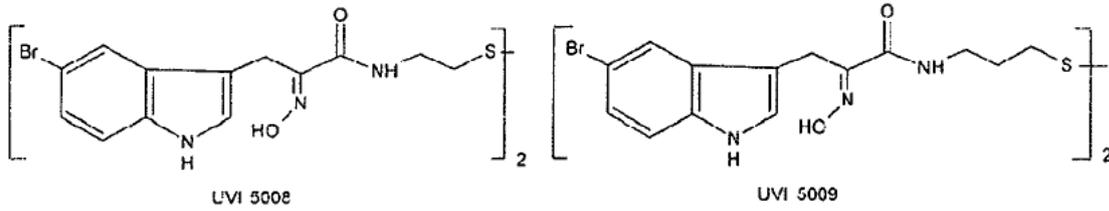
4. Una molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde j es 0.

5. Una molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde X es Br.

25 6. Una molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde W es -. CO-NH-.

7. Una molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ son átomos de hidrógeno.

8. Una molécula según la reivindicación 1, la cual se incluye en la siguiente lista:

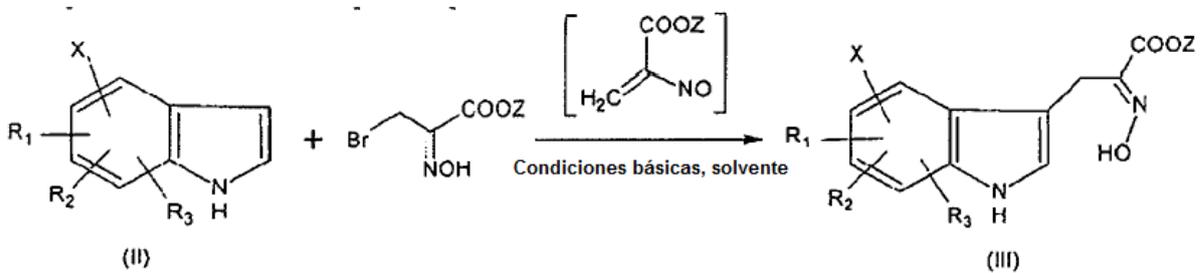


5 9. Un medicamento que comprende una molécula de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal de ésta en un soporte farmacéuticamente aceptable.

10. Uso de una molécula de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar un tumor o un cáncer.

10 11. Uso según la reivindicación 10, para la prevención y/o tratamiento de un cáncer seleccionado de: cáncer de pulmón, de ovario, de sistema nervioso central (CNS), de piel, y de colon, o leucemia.

12. Un método para la síntesis de una molécula de fórmula (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, con $W=-CO-NH-$, caracterizado por que comprende al menos una etapa como se describe en el esquema 3, donde:

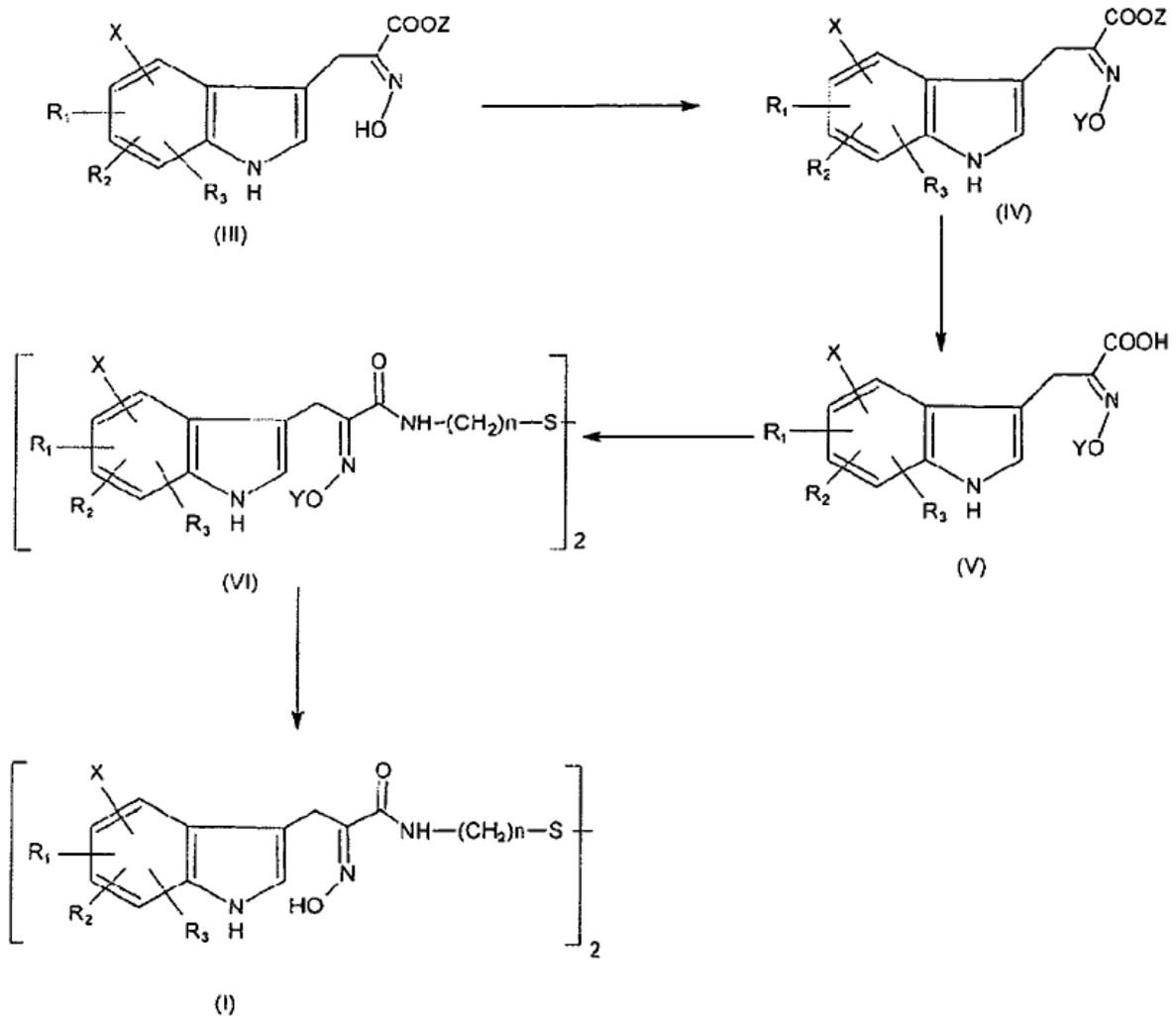


Esquema 3

5 el indol (II) es alquilado con aproximadamente un equivalente de nitrosoacrilato $CH_2=C(NO)-COOZ$, en el cual Z representa un grupo seleccionado de: un grupo alquilo C_1-C_6 , fenilo, arilo, generado *in situ* a partir de la correspondiente bromo-oxima y la reacción se realiza en un medio básico, en un solvente, a temperatura ambiente.

13. Un método según la reivindicación 12, en donde Z es un grupo etilo, el solvente es CH_2Cl_2 , la base es K_2CO_3 .

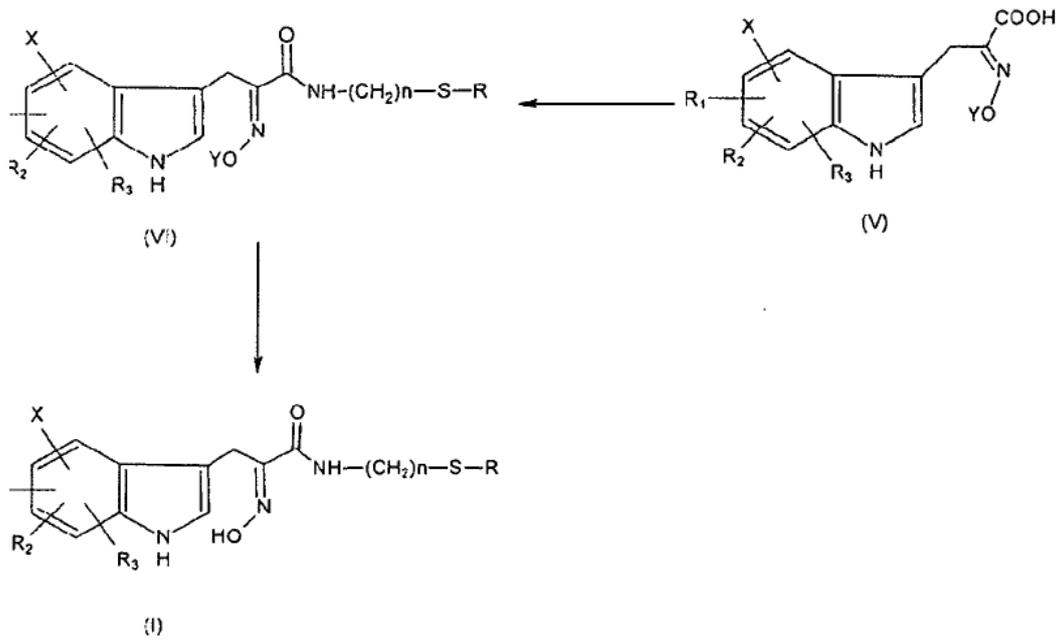
14. Un método según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, **caracterizado por que**, cuando $i=2$ y $j=0$, la primera etapa se continúa mediante el proceso descrito en el Esquema 4:



Esquema 4

5 en donde la oxima (III) se convierte en el compuesto (IV), mediante la protección de la función oxima con un grupo protector Y apropiado, preferiblemente Y es un grupo tritil; a continuación la función éster -COOZ se desprotege a -COOH, mediante un tratamiento apropiado para proporcionar la molécula (V); a continuación, esta molécula se hace reaccionar con la di-amina $\text{NH}_2\text{-(CH}_2)_n\text{-S-S-(CH}_2)_n\text{-NH}_2$ apropiada para proporcionar (VI), y luego la función oxima se libera para producir la molécula de fórmula (I).

15. Un método según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, caracterizado por que, cuando $i=j=1$, la primera etapa se continúa mediante el proceso descrito en el esquema 5:



Esquema 5

donde el compuesto (VI) se hace reaccionar con la amina $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-\text{R}$ y la función oxima se desprotege para proporcionar (I).

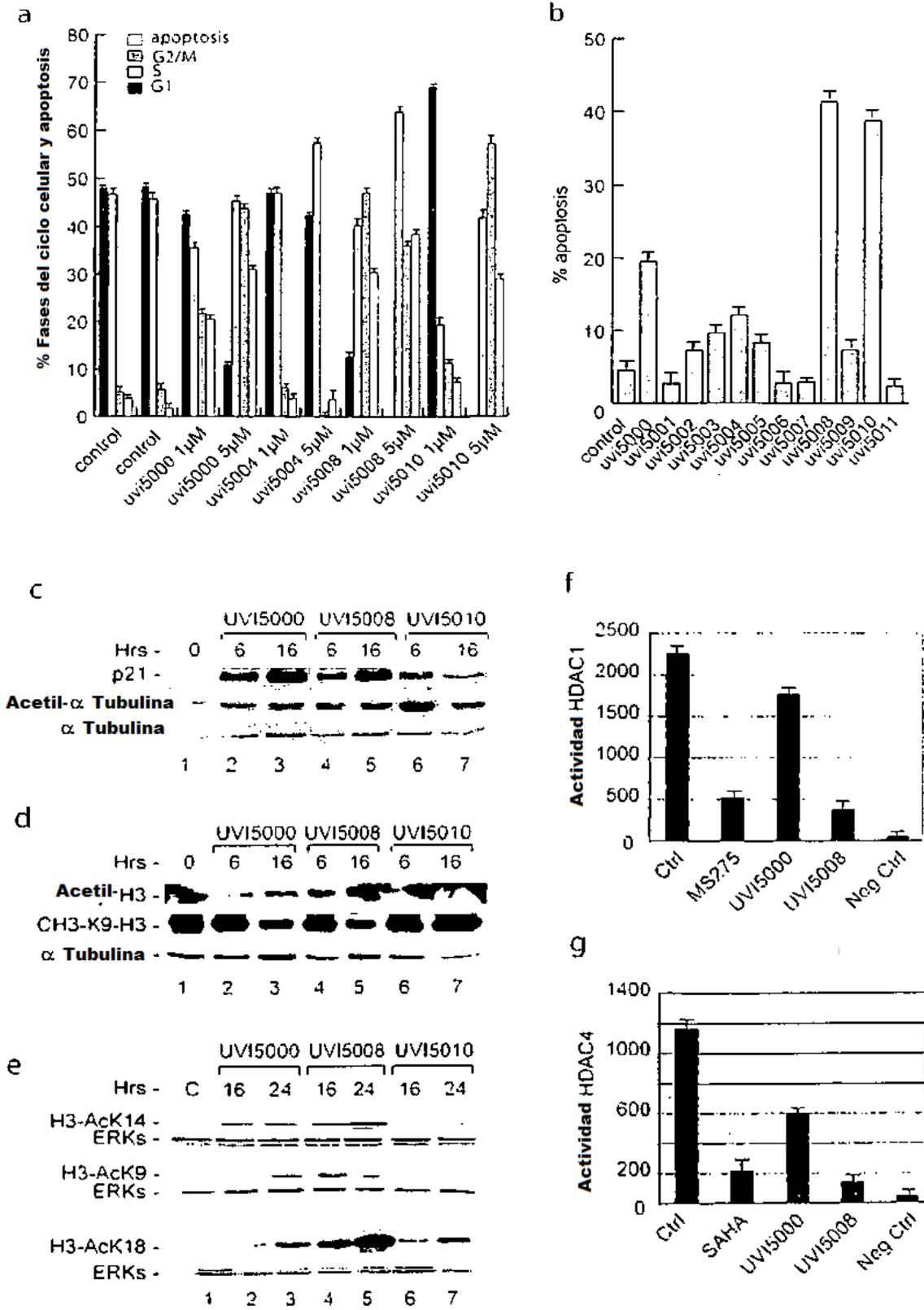


FIGURA 1

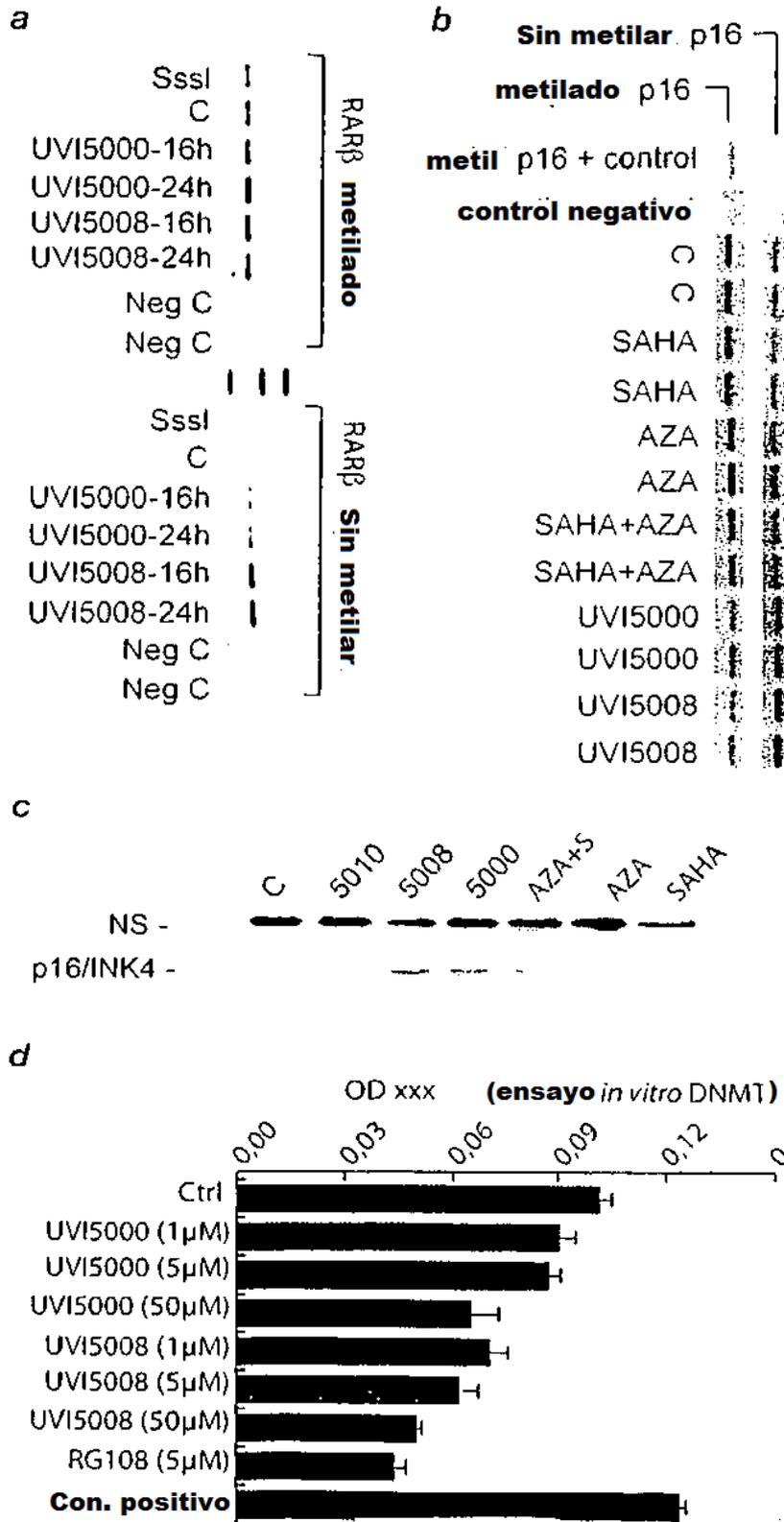


FIGURA 2

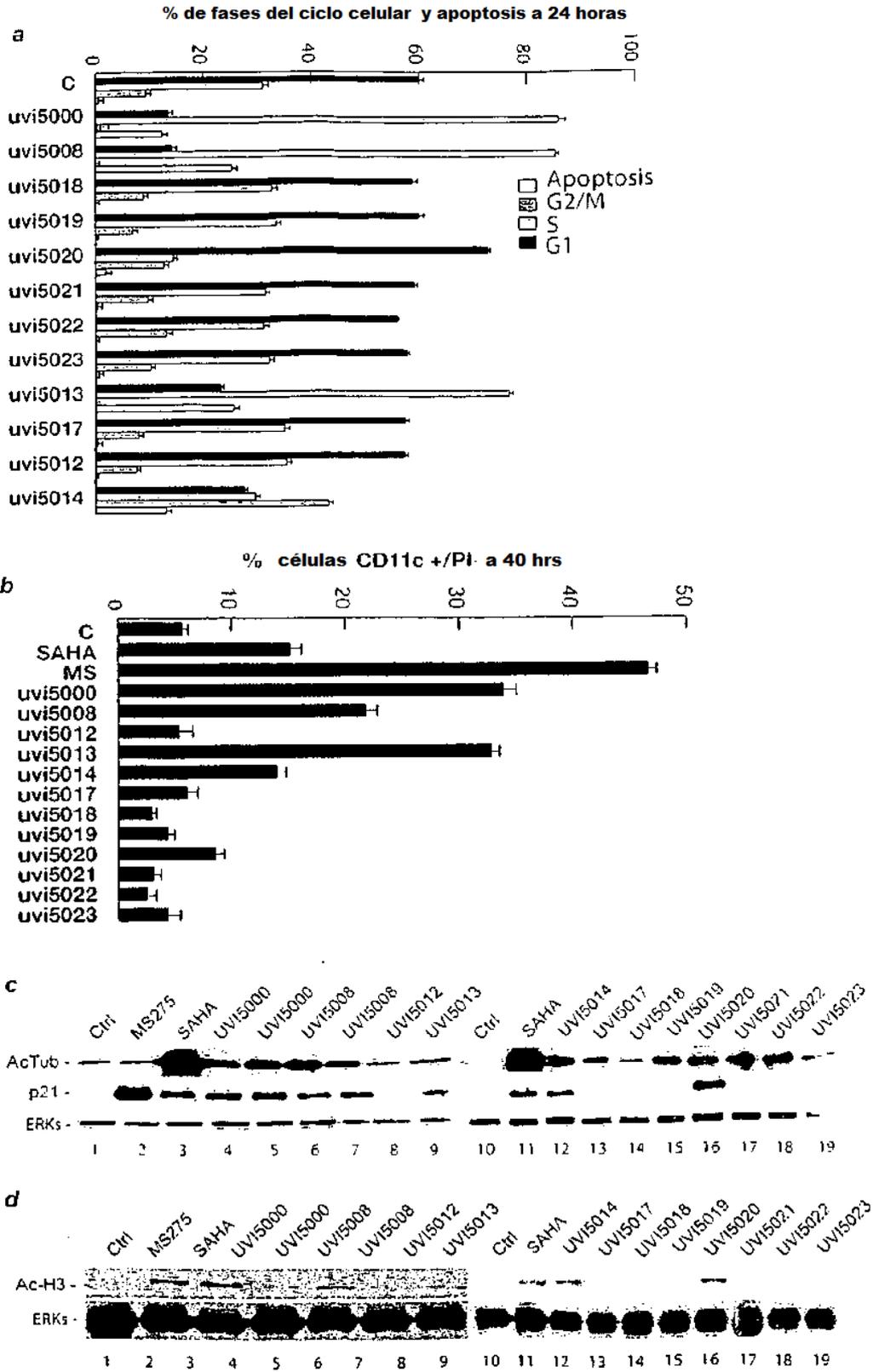


FIGURA 3

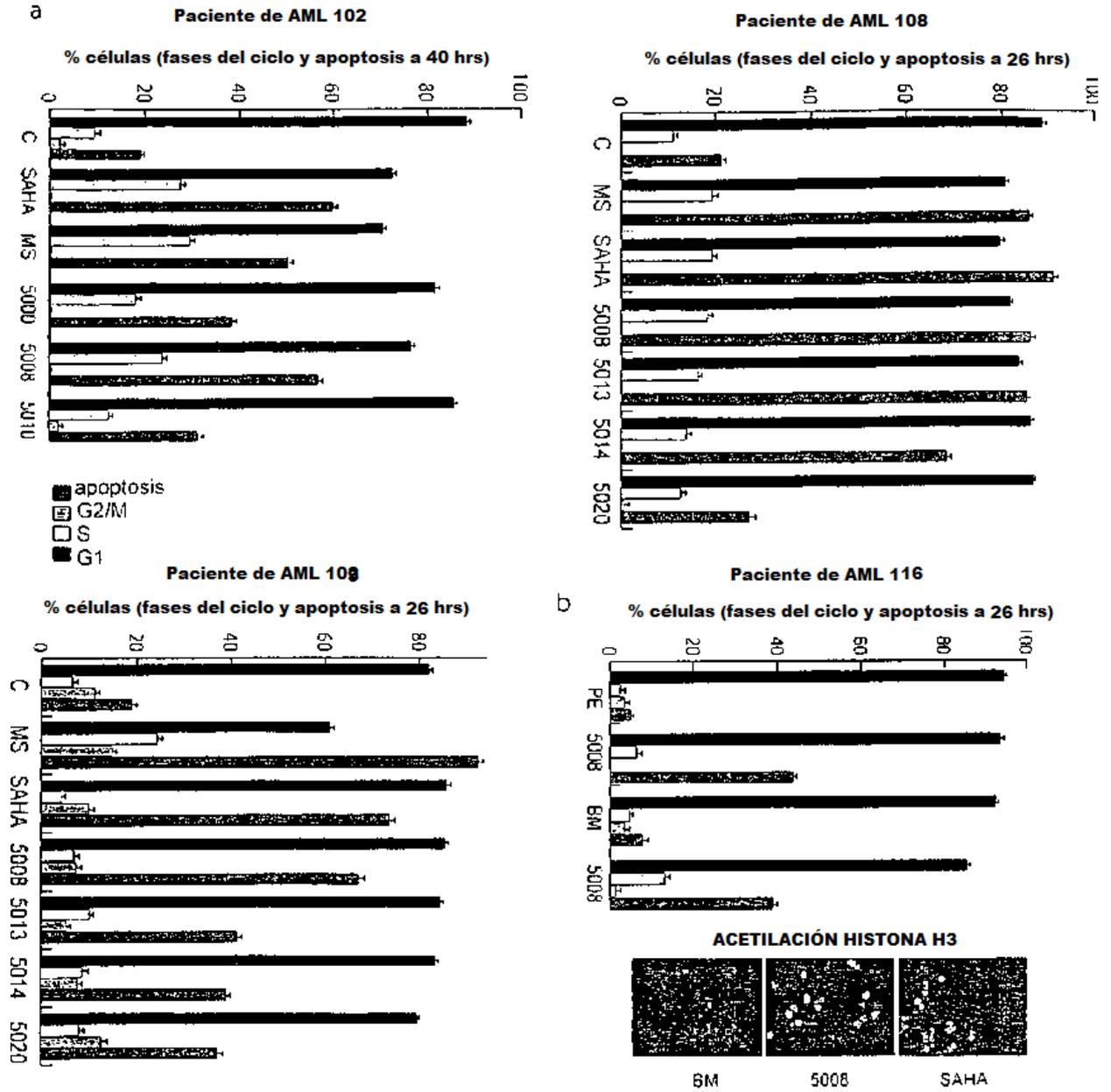


FIGURA 4

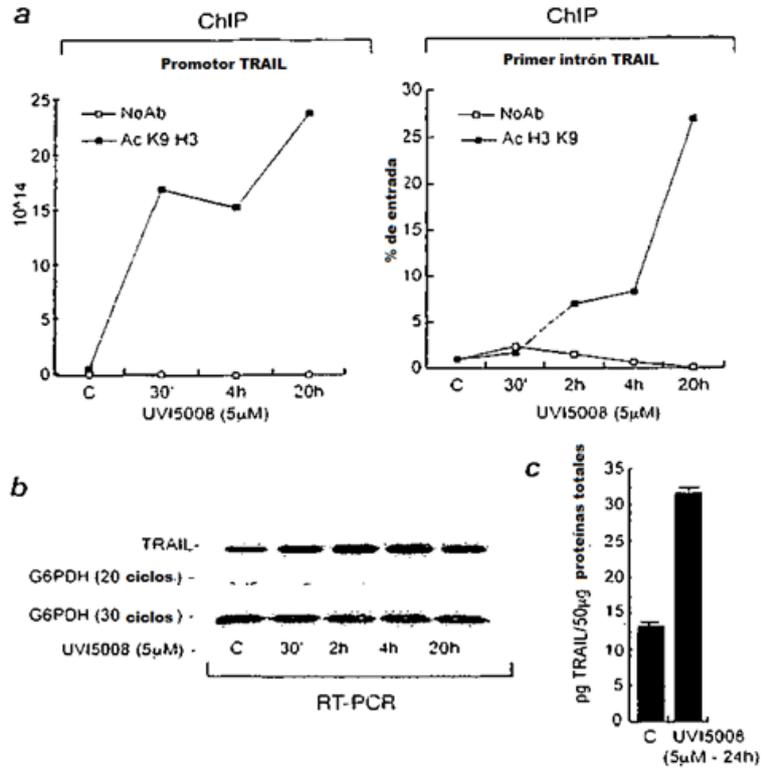
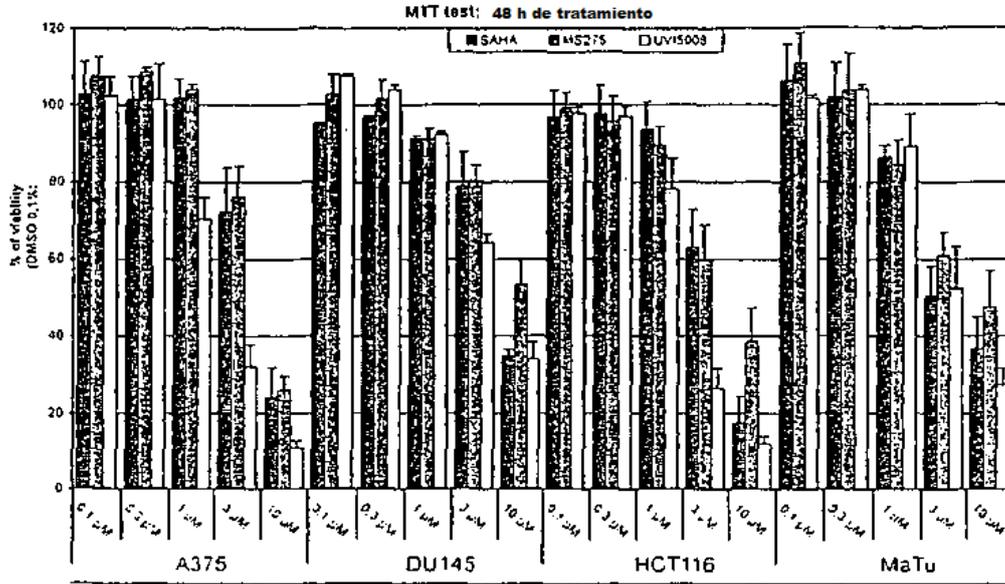
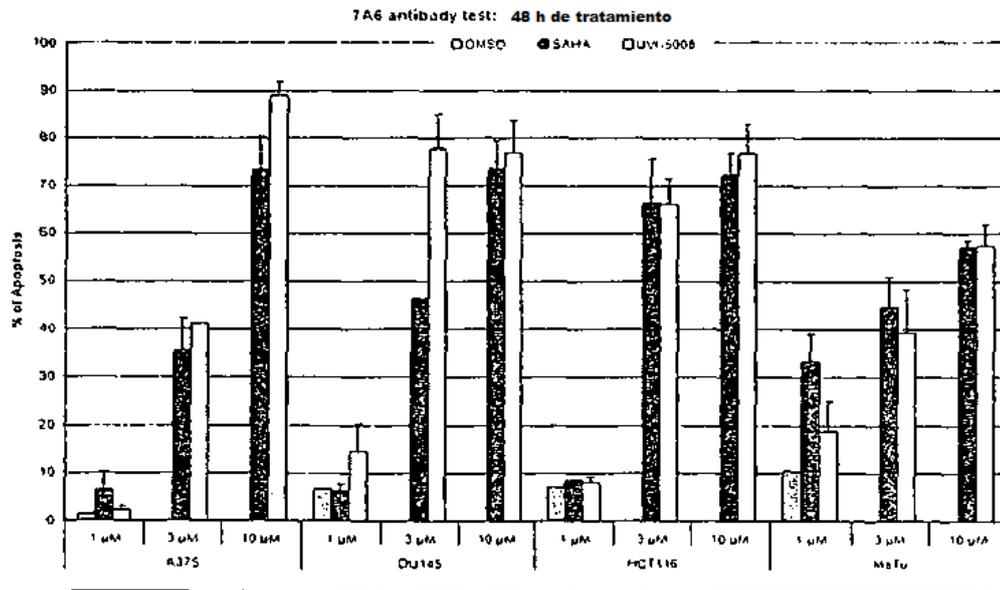


FIGURA 5

a



b



Apoptosis

FIGURA 6

ES 2 372 717 T3

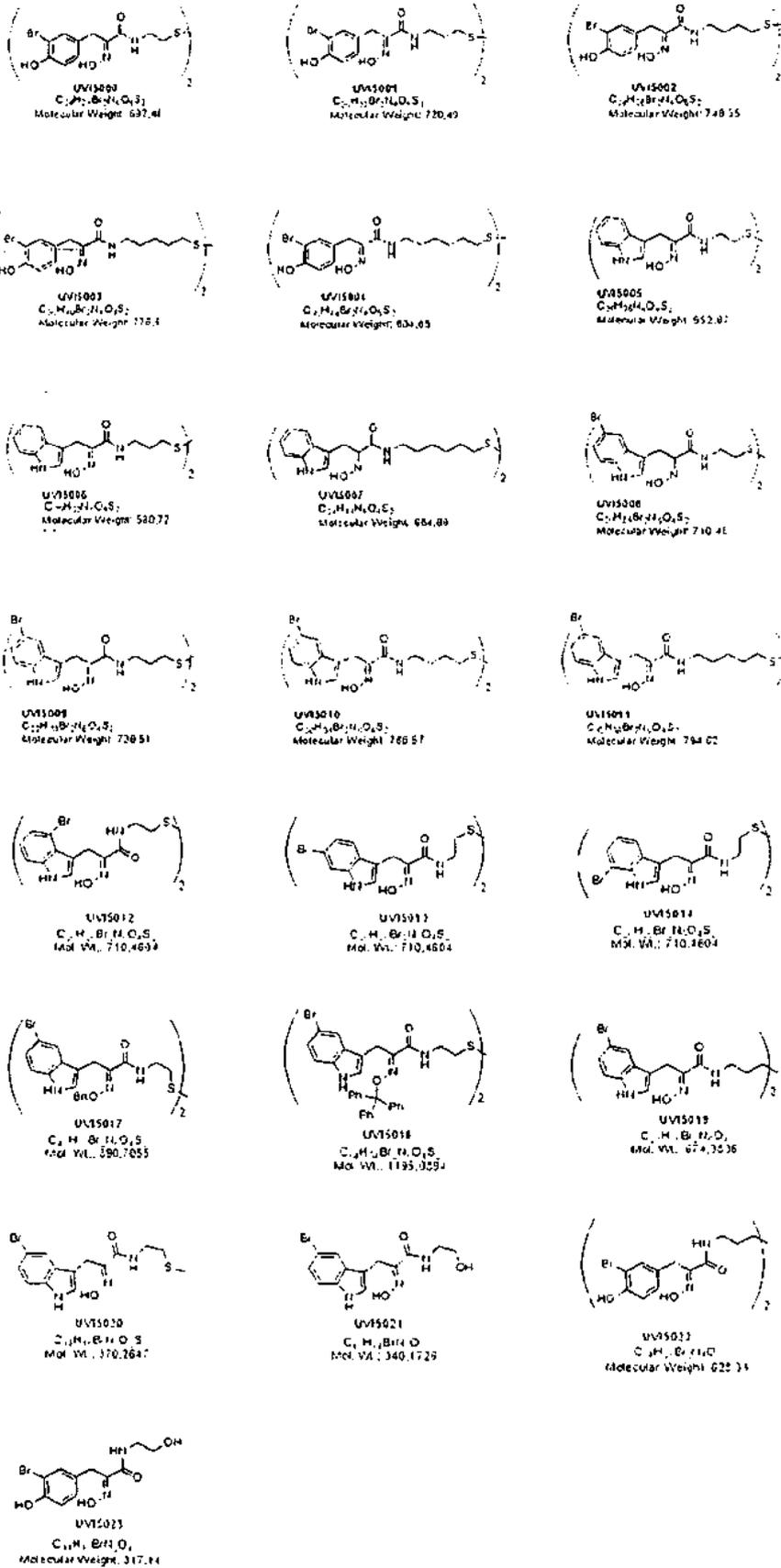


FIGURA 7

línea celular A-375

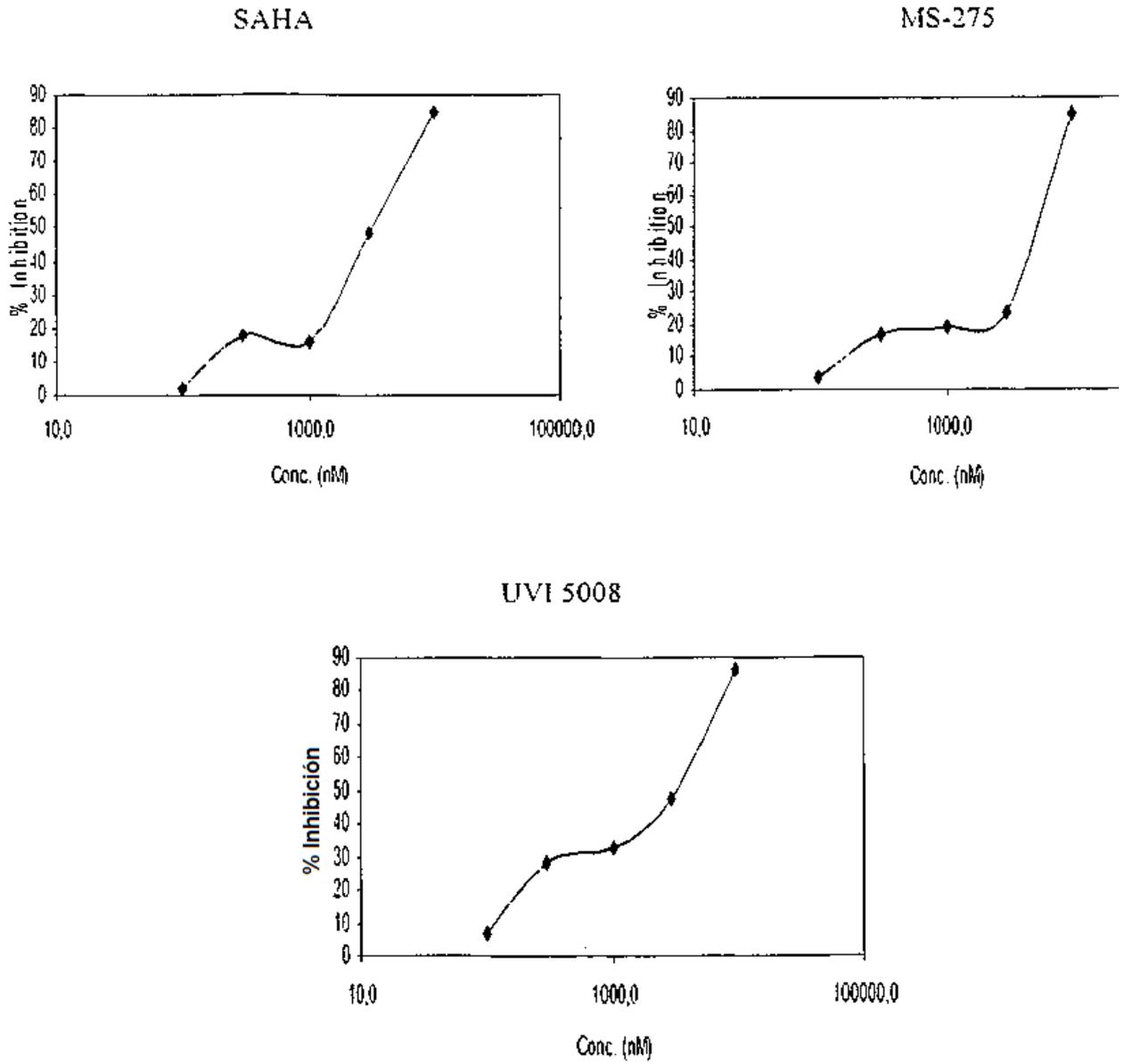
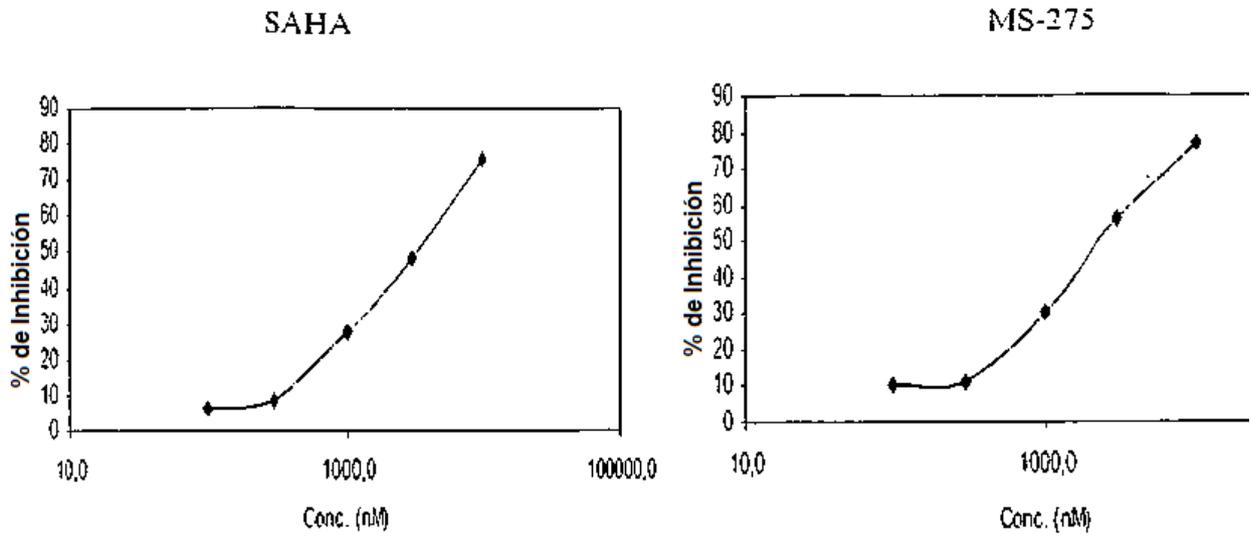


FIGURA 8A

Linea celular HCT-116



UVI 500S

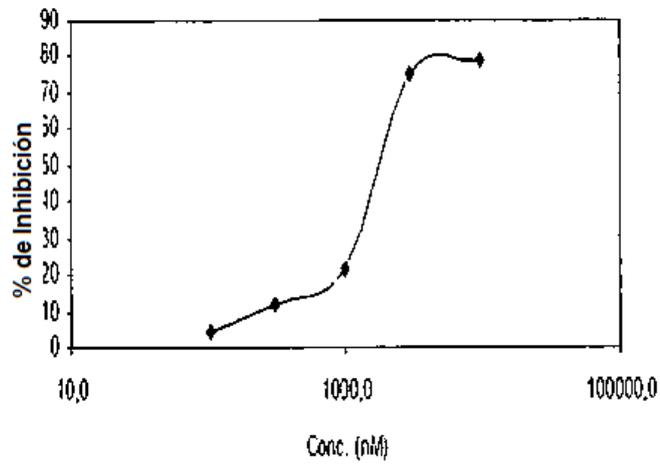
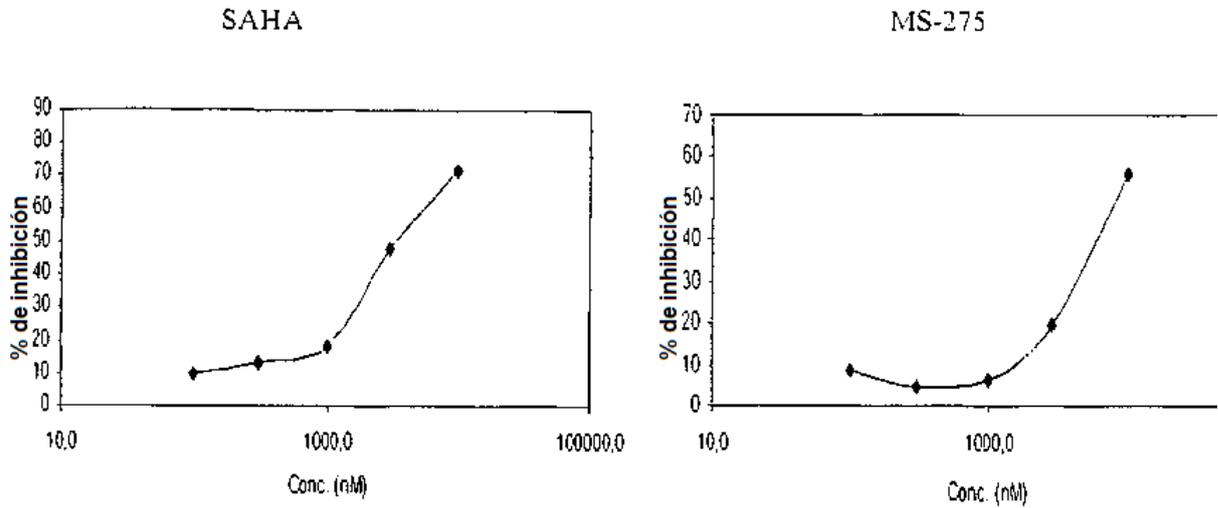


FIGURA 8B

Linea celular DU-145



UVI 5008

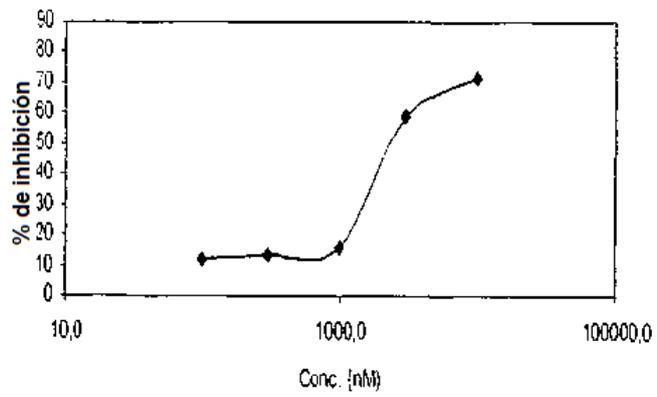


FIGURA 8C

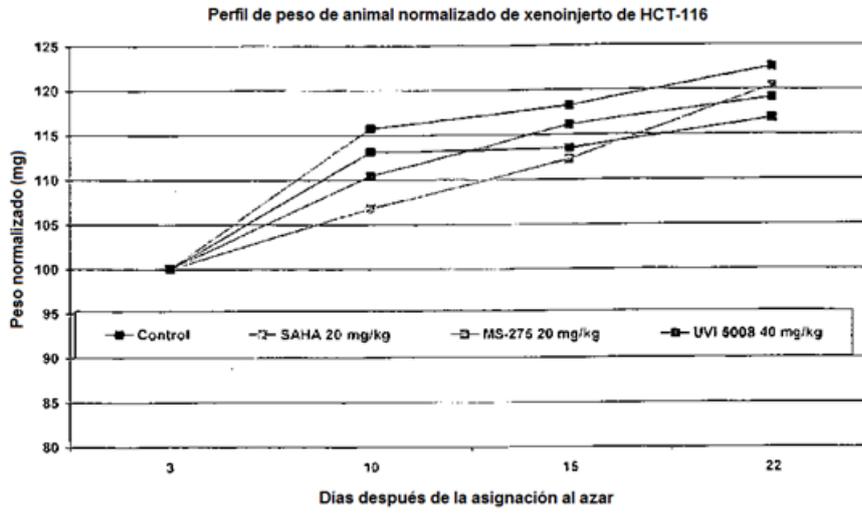


FIGURA 9A

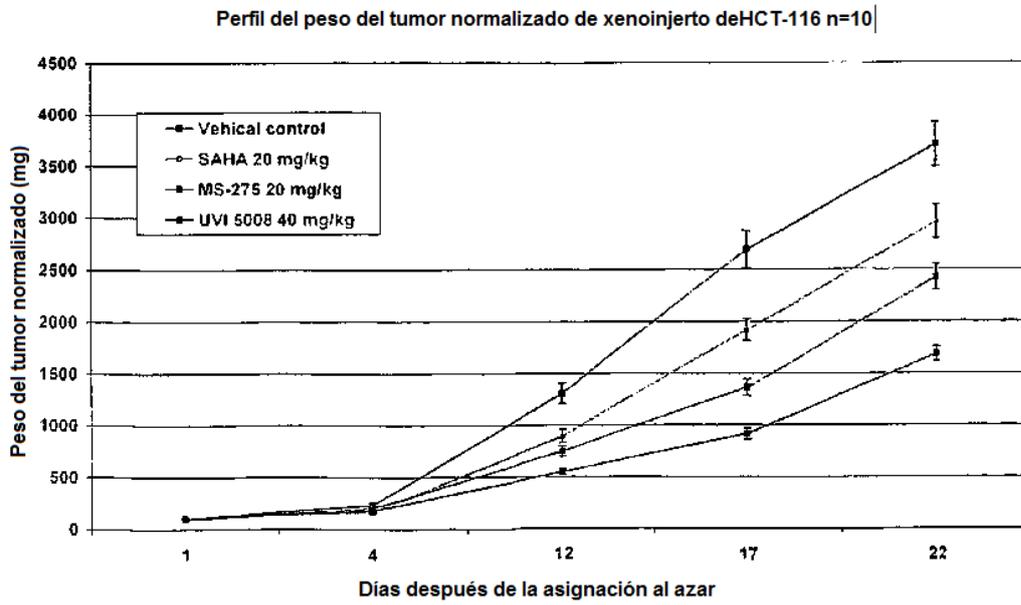


FIGURA 9B

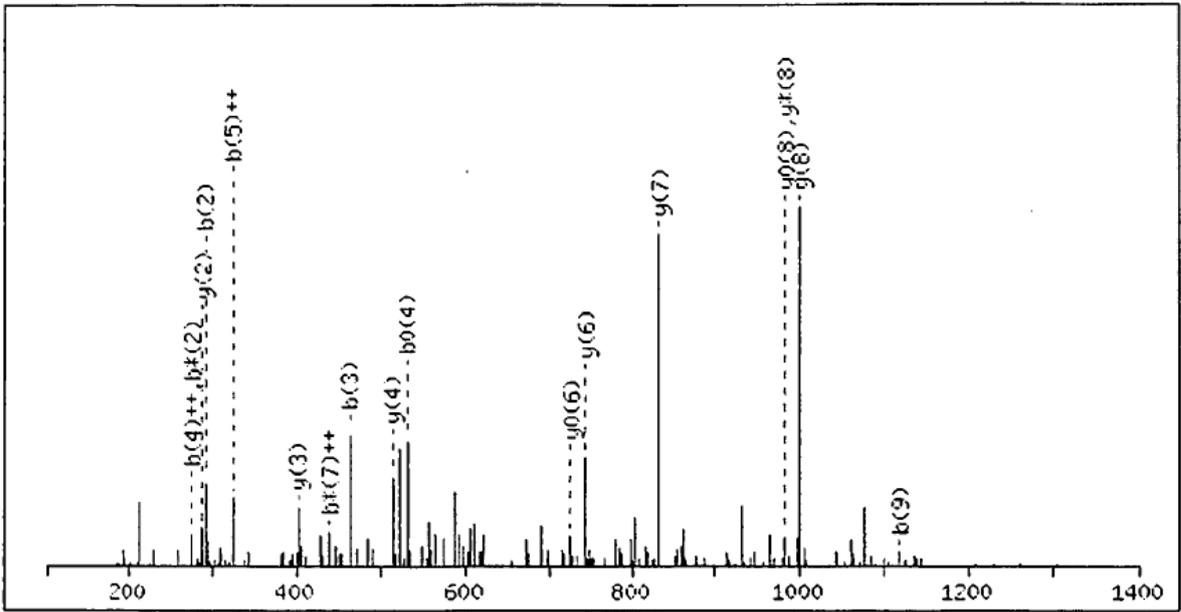


FIGURA 10A

#.	b	b ⁺⁺	b [*]	b ^{*++}	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y [*]	y ^{*++}	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	164.0706	82.5389					Y							10
2	292.1292	146.5682	275.1026	138.0550			Q	1129.6575	565.3324	1112.6310	556.8191	1111.6470	556.3271	9
3	462.2347	231.6210	445.2082	223.1077			K	1001.5990	501.3031	984.5724	492.7898	983.5884	492.2978	8
4	549.2668	275.1370	532.2402	266.6237	531.2562	266.1317	S	831.4934	416.2504	814.4669	407.7371	813.4829	407.2451	7
5	650.3144	325.6609	633.2879	317.1476	632.3039	316.6556	T	744.4614	372.7343	727.4349	364.2211	726.4508	363.7291	6
6	779.3570	390.1821	762.3305	381.6689	761.3465	381.1769	E	643.4137	322.2105	626.3872	313.6972	625.4032	313.2052	5
7	892.4411	446.7242	875.4145	438.2109	874.4305	437.7189	L	514.3711	257.6892	497.3446	249.1759			4
8	1005.5251	503.2662	988.4986	494.7529	987.5146	494.2609	L	401.2871	201.1472	384.2605	192.6339			3
9	1118.6092	559.8082	1101.5827	551.2950	1100.5986	550.8030	I	288.2030	144.6051	271.1765	136.0919			2
10							R	175.1190	88.0631	158.0924	79.5498			1

FIGURA 10B

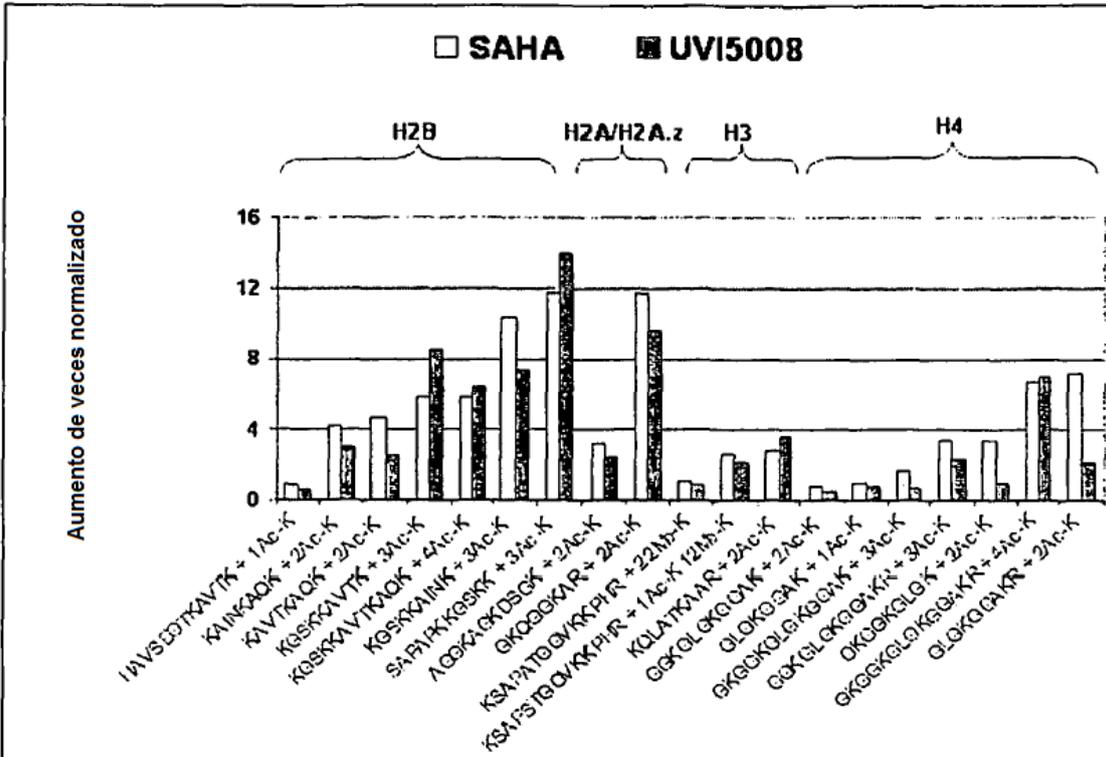


FIGURA 11

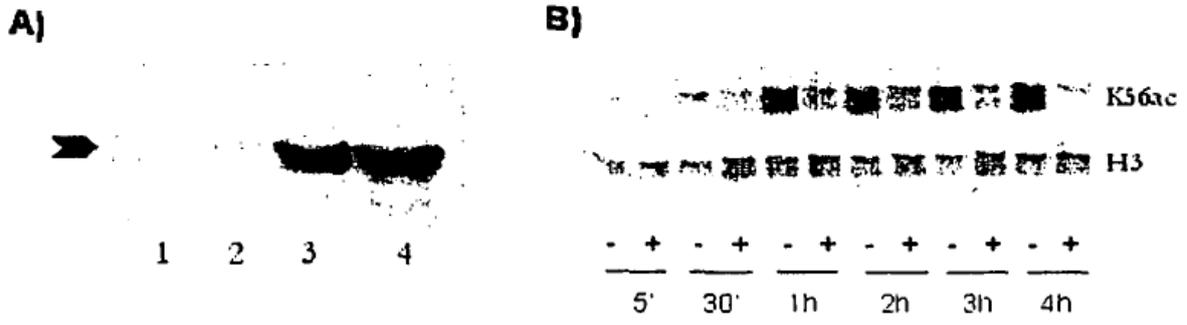


FIGURA 12

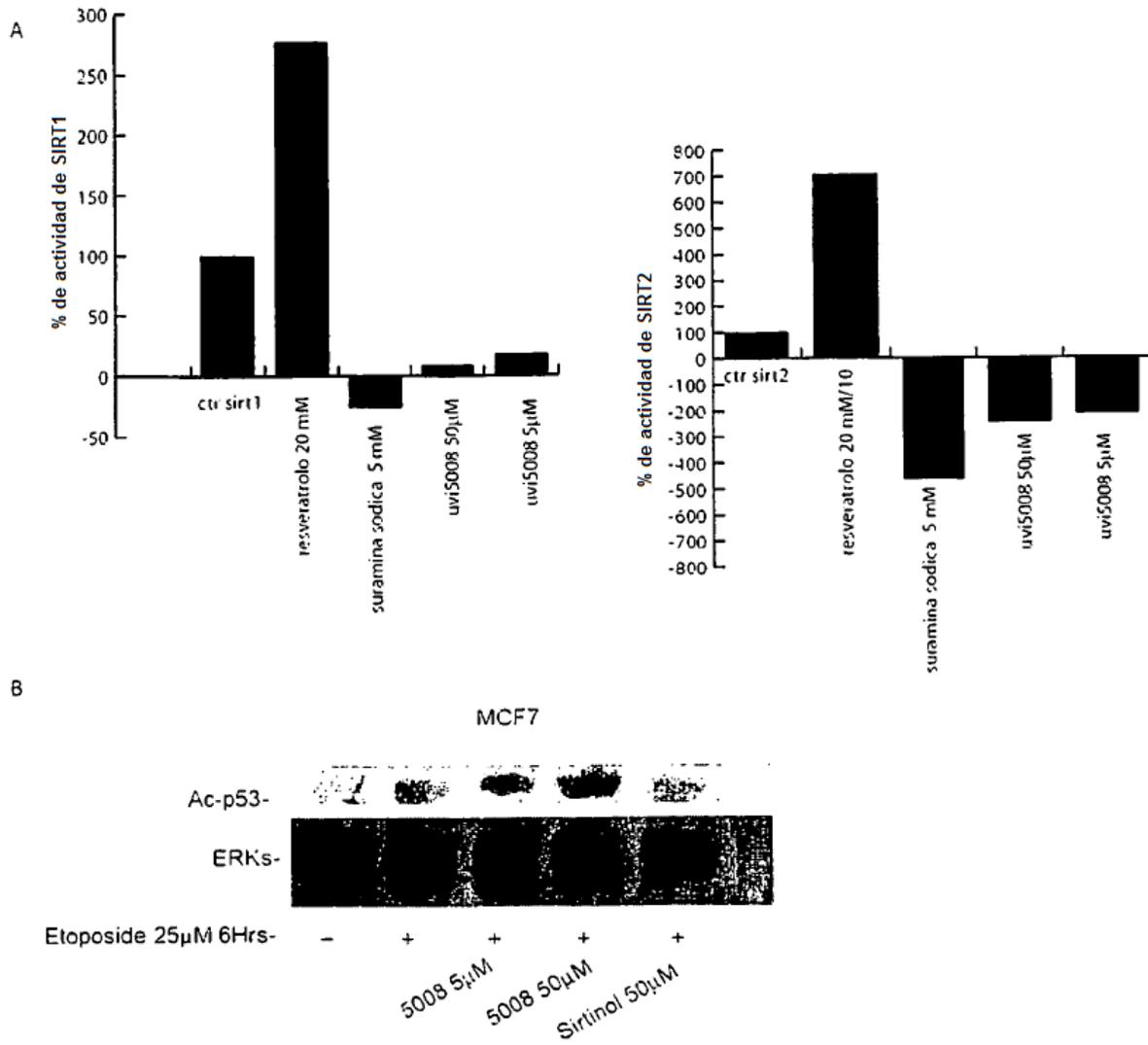


FIGURA 13