

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 817**

21 Número de solicitud: 201031844

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4704** (2006.01)

**A61K 31/473** (2006.01)

**A61P 35/04** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **14.12.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**12.07.2012**

71 Solicitante/s:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC)  
Avda. María Luisa s/n; Palacio-Pabellón de Perú  
41013 Sevilla, ES y  
FUNDACIÓ IMIM**

72 Inventor/es:

**OLIVER POZO, JAVIER;  
RODRÍGUEZ LARA, MARÍA ISABEL y  
GARCÍA DE HERREROS, ANTONIO**

74 Agente/Representante:

**Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **INHIBIDORES DEL FACTOR PROMETASTÁSICO SNAIL-1.**

57 Resumen:

Inhibidores del factor prometastásico snail-1.

La presente invención se refiere al uso de inhibidores del factor prometastásico snail-1 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la metástasis pulmonar.

ES 2 384 817 A1

## DESCRIPCION

Inhibidores del factor prometastásico snail-1

La presente invención se refiere al uso de inhibidores del factor prometastásico Snail-1 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la metástasis pulmonar.

## 5 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El melanoma es un tumor maligno muy resistente al tratamiento en el que no están aún clarificados los procesos moleculares, celulares y fisiopatológicos que determinan la transición del tumor primario local al melanoma metastático.

10 El proceso de transición-epitelio mesénquima (EMT) es esencial para el desarrollo adecuado durante la embriogénesis proporcionando a las células la capacidad de migrar (*Guarino M. Histol Histopathol 10(1):171-84, 1995; Guarino M. Int J Biochem Cell Biol 39(12):2153-60, 2007*). Además, la EMT se asocia con la invasión tumoral y la metástasis (*Cavallaro U y Christofori G. Nat Rev Cancer 4(2):118-32, 2004; Sarrío BD, Perez-Mies B, Hardisson D, Moreno-Bueno G, Suarez A, Cano A, Martín-Perez J, Gamallo C, Palacios J. Oncogene 23(19):3272-83, 2004*). Entre los marcadores moleculares de la EMT se encuentra una down-regulación de marcadores epiteliales, como la E-caderina que es la responsable de la pérdida de la adhesión célula-célula y la up-regulación de marcadores mesenquimales como Vimentina y N-caderina, la reorganización del citoesqueleto de actina y/o translocación nuclear de factores de transcripción controlados por la EMT, como  $\beta$ -catenina y miembros de la familia de SNAIL (*Thiery JP y Sleeman JP. Nat Rev Mol Cell Biol 7(2):131-42, 2006*).

15 Los miembros de la familia de SNAIL (SNAIL1 y Slug) son esenciales para provocar EMT durante el desarrollo embrionario (*Barrallo-Gimeno A y Nieto MA. Development 132(14):3151-61, 2005; De Craene B y van Roy F. Cell Signal 17(5):535-47, 2005; Peinado H, Olmeda D, Cano A. Nat Rev Cancer 7(6):415-28, 2007*) y la progresión tumoral (*Peinado H, Portillo F, Cano A. Cell Cycle 4(12):1749-52, 2005; Thiery JP. Nat Rev Cancer 2(6):442-54, 2002*). Se ha identificado el factor de transcripción SNAIL1 como un represor de la expresión de E-caderina, puesto que tiene una interacción directa con la caja E2 del elemento E-pal del promotor (*Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baullida J, Garcia de Herreros A. Nat Cell Biol 2(2):84-9, 2000; Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. J Cell Sci 116(Pt3):499-511, 2003; Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. Nat Cell Biol 2(2):76-83., 2000*). Además, SNAIL1 reprime indirectamente la expresión de E-caderina, induciendo la síntesis de Zeb1, un represor transcripcional (*Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, Sancho E, Dedhar S, de Herreros AG, Baullida J. J Biol Chem 277(42):39209-16, 2002*). Este factor también se une a la caja E del promotor de E-caderina inhibiendo la expresión de este gen (*Grooteclaes ML, Frisch SM. Oncogene, 19(33):3823-8, 2000*).

20 La función de SNAIL1 se regula a nivel postranslacional: la estabilidad de la proteína SNAIL1 y su localización celular están controladas por la fosforilación dependiente de GSK3 $\beta$  y su consecuente ubiquitinación. La degradación de SNAIL por GSK3 $\beta$  puede ser atenuada por Loxl2, un miembro de la familia de genes de las lisil oxidasas (*Peinado H, Portillo F, Cano A. Cell Cycle 4(12):1749-52, 2005*), resultando en la estabilización de SNAIL y promoviendo la EMT. Recientemente, se ha demostrado que la hipoxia controlada por la ubiquitina ligasa Fbxl-14 modula la estabilidad de la proteína SNAIL1 independientemente de su previa fosforilación (*Vinas-Castells, Beltran M, Valls G, Gomez I, Garcia JM, Montserrat-Sentis B, Baullida J, Bonilla F, de Herreros AG, Diaz VM. J Biol Chem 285(6):3794-805, 2010*).

25 La poli(ADP-ribosa)polimerasa-1 (PARP-1) es el principal miembro de la familia de enzimas con capacidad catalítica de poli(ADP-ribosil)ación. PARP-1 es una proteína nuclear conservada que se une rápida y directamente a diversas estructuras del DNA, incluyendo roturas de cadena sencilla y de cadena doble (*Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Nat Rev Mol Cell Biol 7(7):517-28, 2006*). Ambos procesos activan la capacidad catalítica de la enzima, que modula la actividad de un gran número de proteínas nucleares por uniones covalentes a las cadenas de ADP-ribosa mayoritarias. Los miembros de la familia PARP tienen un dominio catalítico conservado que contiene el sitio activo. PARP-1 y PARP-2 son los únicos miembros de la familia PARP cuya actividad es estimulada por roturas en la cadena de DNA. PARP usa dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) como sustrato para sintetizar poli(ADP-ribosa) (PAR) (*Hassa PO, Hottiger MO. Front Biosci 13:3046-82, 2008*). A nivel celular, la formación de PARP-1 está implicada en un número de funciones celulares como el mantenimiento de la estabilidad genómica, regulación transcripcional, metabolismo energético y muerte celular (*Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Nat Rev Mol Cell Biol 7(7):517-28, 2006*).

30 La poli(ADP-ribosil)ación finaliza con la liberación de moléculas poli(ADP-ribosil)adas (cargadas negativamente) del DNA. Los polímeros de ADP-ribosa están sujetos a la degradación por la poli(ADP-ribosa)glicohidrolasa (PARG) (*Lin W, Ame JC, Aboul-Ela N, Jacobson EL, Jacobson MK. J Biol Chem 272(18):11895-901, 1997*). La poli(ADP-ribosil)ación es una modificación inmediata y covalente; es asimismo, un mecanismo postransduccional transitorio de modificación de proteínas celulares (*Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Nat Rev Mol Cell Biol 7(7):517-28, 2006*). La poli(ADP-ribosil)ación de histonas induce la relajación de la cromatina, permitiendo a los factores de transcripción acceder al DNA; PARP también participa en promover/mejorar los complejos de unión para optimizar la transcripción (*Jagtap P y Szabo C. Nat Rev Drug Discov 4(5):421-40, 2005; Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Nat Rev Mol Cell Biol 7(7):517-28, 2006*).

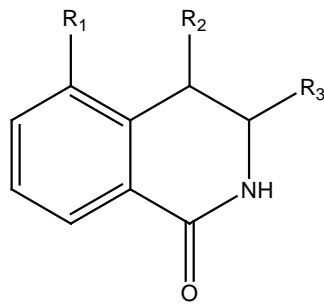
Por lo tanto, en vista de lo anteriormente expuesto, surge la necesidad de desarrollar nuevas moléculas que inhiban la metástasis pulmonar o que sean capaces de limitar la activación del factor de transcripción SNAIL-1.

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

5 La presente invención proporciona un nuevo uso de compuestos de inhibidores de PARP para disminuir fuertemente la metástasis pulmonar usando células aisladas de melanoma.

10 Esta capacidad se ha comprobado que se debe a una característica hasta la fecha desconocida de estos inhibidores, que es su capacidad para limitar la activación del factor de transcripción SNAIL-1, que es fundamental en el cambio fenotípico que conduce a un tumor primario a adquirir la capacidad de metástasis en un proceso denominado transición epitelio-mesénquima (EMT). Dado que este proceso es común en todas las metástasis de tumores de origen epitelial (que son la mayoría de los tumores sólidos y de mayor incidencia) el uso de estos inhibidores tiene una aplicación clínica antimetastásica, proceso frente al que existen muy pocas herramientas terapéuticas.

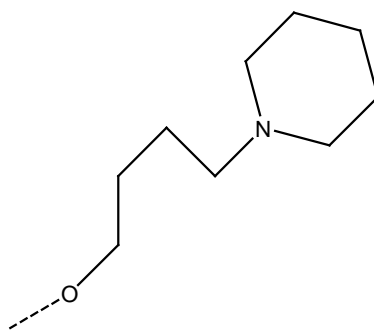
Por lo tanto un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I)



(I)

donde:

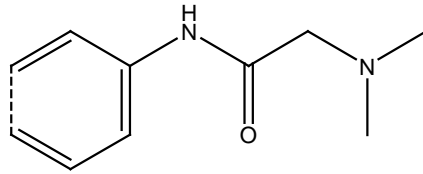
25 R<sub>1</sub> se selecciona entre hidrógeno o un sustituyente de fórmula (II),



(II)

R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son hidrógeno o están unidos formando un sustituyente de fórmula (III),

5



(III)

o sus isómeros o solvatos

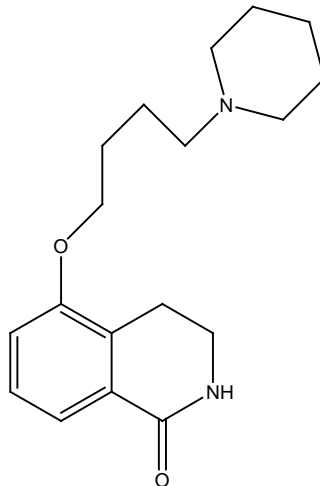
10

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o condición mediada por el factor de transcripción Snail-1, donde dicha enfermedad o condición es la metástasis pulmonar.

Una realización preferida se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I) donde R<sub>1</sub> es el sustituyente de fórmula (II).

De manera preferida, cuando R<sub>1</sub> es el sustituyente de fórmula (II), R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son hidrógeno:

15



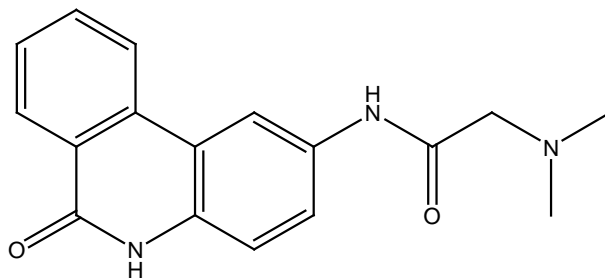
20

25

Otra realización preferida se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I) donde R<sub>1</sub> es hidrógeno.

De manera preferida cuando R<sub>1</sub> es hidrógeno y R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> están unidos formando el sustituyente de fórmula (III):

30



35

Otra realización preferida se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I) como inhibidor del factor de transcripción Snail-1 en ensayos biológicos.

5 El compuesto de la invención puede estar en forma cristalina como compuesto libre o como solvato. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 **Figura 1.** a) Análisis por western-blotting de la expresión de Snail-1 en células de melanoma aisladas y tratadas con el inhibidor de PARP, PJ-34. b)

Efectos de la supresión de PARP sobre Snail-1 y E-cadherina. c) Inmunofluorescencia indirecta de la distribución de E-cadherina and Snail1 en células de melanoma humano, A375, tratadas con el inhibidor de PARP, PJ-34 o en células sin tratamiento (control). d) Western blot que muestra la localización subcelular de Snail1 tras el tratamiento con PJ34.

**Figura 2.** Reducción de la vida media de Snail1 tras la inhibición de PARP.

20 a) Las células A375 se trataron con cicloheximida (100µM), o b) con KU - 0058949 + Cicloheximida a distintos tiempos: 0, 15, 30, 60 y 120 min y se analizó por western blot Snail1. c) Los resultados (a partir de un experimento representativo) se expresan como el porcentaje de señal de Snail1 en comparación con el β-actina. El ratio se ha establecido en un 100 % a tiempo cero. d) Expresión del mRNA de Snail1 tras el tratamiento con KU- 0058949 a distintos tiempos: 0, 15, 30, 60 y 120 minutos en células A375.

25 **Figura 3.** a) Papel in vitro de la poli(ADP-ribosil)ación en la interacción con Snail-1. La poli(ADP-ribosil)ación de Snail-1 fué detectada por autoradiografía. b) western-blotting del análisis de HA-Snail1. c) In vivo, PAR inmunoprecipitación de células A375 tratadas con el inhibidor de PARP-1, Ku0058949. d) Efecto del silenciamiento de PARG en la acumulación de Snail-1 en células A375. Los niveles de ARNm de PARG se evaluaron por PCR cuantitativa a tiempo real. e) En esta situación, la expresión de proteína de Snail1 y PAR se analizó por western blot.

30 **Figura 4.** a) Pull-down en células Cos1 para ver la asociación entre PARP y Snail. b) Pull-down en presencia del inhibidor de PARP, Ku0058949. c) Coimmunoprecipitación de la proteína endógena de PARP-1 y d) Snail1 en células de melanoma A375. Un anticuerpo irrelevante se usó como control negativo. e) Inmunoprecipitación de PARP-1 para analizar por western-blot el efecto de Snail1 y la activación de PARP-1 en la formación de complejos SNAIL/PARP-1 en células A375 tratadas con KU-0058949 en presencia o ausencia de TGF-β1 para estimular la vía de Snail1 o con agentes nocivos para el ADN (Doxorrubicina). f) Disección de los dominios de interacción de PARP-1 con Snail1. g) Disección de los dominios de interacción de Snail con

PARP-1.

### EJEMPLOS:

40 Para realizar estos experimentos se utilizaron las células G361, que se cultivaron en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con Suero bovino fetal inactivo al 10% y gentamicina (Gibco). Las células A375 se mantuvieron en DMEM suplementado con penicilina (50 U/ml), estreptomycin (50 µg/ml), L-glutamina (300 µg/ml), MEM aminoácidos no esenciales (Gibco) y FBS al 10 %. Las células Cos1 se cultivaron en DMEM (Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal activo al 10% (FBS) y Gentamicina. Todas las células crecieron en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

45 Se usaron dos inhibidores de PARP distintos: [N-(6-Oxo-5,6-dihydrofenanthridin-2-il)N,N-dimetilacetamida] disuelto en agua a una concentración de 10 µM, y Ku0058948 a una concentración de 100 nM.

**Relativos a la figura 1) Disminución de Snail y de la acumulación de ECadherina inducidas por la inhibición de PARP-1 y por el silenciamiento de PARP-1.**

50 a) El tratamiento con el inhibidor de PARP, PJ34, durante 24 horas (10 µM) reduce los niveles de Snail1 en células de melanoma humano G361.

b) El silenciamiento de PARP-1 por ARN de interferencia en células A375, de melanoma humano, induce una disminución de Snail1 y el consiguiente aumento en la expresión de E-Cadherina. Las células A375 se transfectaron transitoriamente con un ARN de interferencia irrelevante (SIMA) o con un ARN interferente de PARP-1 (Santa Cruz

- Biotechnology). La transfección se llevó a cabo usando Lipofectamine Plus Reagent (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante, 48 horas después de la transfección, las células fueron recogidas para western blot. y se midió la expresión de ECadherina y Snail-1. Como control de carga se usaron los niveles de  $\beta$ -actina. Para analizar la expresión de Snail1 y E-Cadherina, por western blot, se lavaron las células dos veces con PBS, se rasparon con buffer Laemmli (1 M Tris, 20 % SDS y 10 % glicerol) y se sonicaron. La concentración de proteína se determinó usando el análisis por Lowry. Para el análisis por western blot, se cargó la misma cantidad de proteína total desnaturalizada y se separaron en geles SDS de poliacrilamida. Las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) que después se bloqueó. Los anticuerpos primarios usados son: anti E-cadherin y anti-Snail1 de Santa Cruz Biotechnology.
- 5
- 10 Como control interno de carga se usó un anticuerpo monoclonal de  $\beta$ -actina. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron con el sistema de ECL Plus (Amersham Biosciences).
- c) Inmunofluorescencia indirecta de la distribución de E-cadherina and Snail1 en células de melanoma humano, A375, tratadas con el inhibidor de PARP, PJ-34 o en células sin tratamiento (control). Para el análisis de E-Cadherina y Snail1 endógenos se usó un ensayo de inmunofluorescencia siguiendo un protocolo previamente publicado (Dominguez D, Montserrat-Sentis B, Virgos- Soler A, Guaita S, Grueso J, Porta M, Puig I, Baullida J, Franci C, Garcia de Herreros A. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional represor. Moll Cell Biol 23(14):5078-89, 2003).
- 15
- d) Western blot, en células A375, que muestra la localización subcelular de Snail1 tras el tratamiento con PJ34. Para los extractos de proteínas subcelulares (Núcleo/citoplasma), las células se lisaron con buffer de extracción (10 mM Hepes pH 7.8, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl y 0.5 mM DTT) y el sobrenadante se usó como la fracción del extracto citoplasmático y el pellet insoluble como extracto nuclear. El extracto citoplasmático se lavó con un buffer (0.3 M Hepes, 1.4 M KCl y 30 mM MgCl<sub>2</sub>) y el extracto nuclear se resuspendió en otro buffer (20 mM Hepes pH 7.8, 25 % glicerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA y 0.5 mM DTT). Ambos extractos se rotaron durante 30 min a 4°C, se centrifugaron a 15,000xg a 4°C durante 15 minutos y se obtuvieron las fracciones citoplasmáticas y nucleares (sobrenadante).
- 20
- 25 **Relativos a la figura 2.**
- a) Reducción de la vida media de Snail1 tras la inhibición de PARP. Las células A375 se trataron con cicloheximida (100  $\mu$ g/ml), o
- b) con KU-0058949 + Cicloheximida a distintos tiempos: 0, 15, 30, 60 y 120 min. Los lisados celulares totales se prepararon y analizaron por western blot usando anti-Snail1 como anticuerpo primario.
- 30 c) El gráfico muestra la intensidad de la banda correspondiente a Snail1 cuantificándose empleando el software ImageQuant 5.2. Los resultados (a partir de un experimento representativo) se expresan como el porcentaje de señal de Snail1 en comparación con el de  $\beta$ -actina. El ratio se ha establecido en un 100 % a tiempo cero.
- d) La expresión del mRNA de Snail1 tras el tratamiento con KU-0058949 a distintos tiempos: 0, 15, 30, 60 y 120 minutos en células A375.
- 35 **Relativos a la figura 3. Poli (ADP-ribosil)ación de Snail1 *in vitro* e *in vivo*.**
- in vitro*.**
- a) *In vitro*, poly(ADP-ribosil)ación de Snail1. Un plásmido que expresa Snail1, marcado con el epítipo HA, se insertó en un plásmido pcDNA3, y se usó para transfectar las células Cos1. Snail1 se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-HA y se reveló por el western blot de HA-Snail1 (bandas superiores). Para analizar la heteromodificación de la proteína Snail1 por PARP-1, las células Cos1 se transfectaron con HA-Snail1 y se inmunoprecipitó la proteína usando el anticuerpo anti-HA (Santa Cruz Biotechnology), después se recogen con 50 $\mu$ l de bolas de Proteina A Sepharosa (GE Healthcare) y después los inmunocomplejos formados se lavan dos veces con buffer de lisis (20 mM TRIS-HCl pH 7.5, 400 mM NaCl, 20 % glicerol, 5 mM DTT, 0.5 mM Pefabloc, 0.1 % NP-40, PIC, KU- 0058949) y dos veces con DB (20 mM TRIS-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl 0.1% NP-40, PIC). Después de un ultimo lavado con buffer de actividad (50 mM TRIS-HCl pH 8, 0.2 mM DTT, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA), cada muestra se dividió en tres, las bolas se concentraron y se resuspendieron en 300  $\mu$ l de buffer de actividad que contiene o 300 pmol de hPARP-1, 600 pmol mPARP-2 o sin PARP. La reacción se empezó mediante la adición de 180 $\mu$ l de buffer de actividad que contenía DNasa I del DNA del timo de ternero 0.1 $\mu$ M NAD para PARP-1 y 1  $\mu$ M para las muestras del control y PARP-2. Además, cada muestra contenía 1 pmol de (32P)NAD. Tras 10 minutos a 25°C, la reacción se paró añadiendo 50 $\mu$ l de DB frío (en hielo), y las bolas se lavaron tres veces con DB, se resuspendieron en 20  $\mu$ l de buffer de carga, y se analizaron por autorradiografía y b) por western blot.
- 40
- 45
- 50 c) *In vivo* Poly(ADP-ribosil)ación usando un anticuerpo frente a las proteínas modificadas por PAR; pretratamiento con el inhibidor de PARP KU-0058949 (100 nM).

d) Efecto del silenciamiento de PARG en la acumulación de SNAIL-1 en células A375. Las células se transfectaron con PARG o con scrambled siRNA; 48 horas después de la transfección se recogieron extractos totales de ARN y los niveles de ARNm de PARG se evaluaron por PCR cuantitativa a tiempo real. e) En esta situación, la expresión de proteína de Snail1 y PAR se analizaron por western blot.

## 5 Relativos a la figura 4. Disección de los dominios de interacción entre

### PARP-1 y Snail1.

10 a) Pull-down en células Cos1 para estudiar la asociación entre PARP-1 y Snail1. Las células Cos1 se transfectaron usando JetPei con los dominios de PARP-1 fusionados a GST y se hicieron experimentos de pull-down para determinar por western blot las interacciones usando anticuerpos anti-HA y anti- GST. Los complejos se unieron a Glutation-Sefarosa y se analizaron por western blot con anticuerpos para HA y GST (ilustraciones de la derecha). Interacción entre PARP-1 y Snail1 en presencia del inhibidor de PARP KU-0058949 (100 nM). Los complejos se unieron a Glutation-Sefarosa y se analizaron por western blot con anticuerpos para HA y GST. Las células Cos1 se transfectaron con JetPei y se co-precipitaron con los plásmidos que expresan HA-Snail y proteínas de fusión GST (pBC, pBCPARP-1 y pBC-PARP-2). Cuarenta y ocho horas después, las células se lisaron en 20 nM Tris-HCl (pH 7.5), 400 mM NaCl, 20 %  
15 glycerol, 5 mM DTT, 0,5 mM pefabloc e inhibidores de proteasas (Complete Mini; Roche, Mannheim, Germany). Los lisados se purificaron por centrifugación y se incubaron durante 2 horas con glutathione-sepharose 4B (Amersham). Las bolas se lavaron 3 veces con 20 nM Tris-HCl (pH 7.5), 150 to 500 mM NaCl, 0.1 % NP-40 e inhibidores de proteasas. Todas las muestras se resuspendieron en tampón de carga, se calentaron durante 5 minutos y se analizaron por western blot. Posteriormente las membranas se incubaron con anticuerpo anti-GST (IGBMC, Illkirch, Francia) y anti-HA (Santa Cruz). Las membranas se incubaron después con anticuerpos secundarios de peroxidasa de rábano y la inmunoreactividad se detectó por quimioluminiscencia de acuerdo con el fabricante (Amersham).

20 b) Asociación entre PARP-1 y Snail1 en presencia del inhibidor de PARP-1, KU-0058949.

c) Co-inmunoprecipitación de la proteína endógena de Snail1 y d) PARP en células de melanoma A375. Un anticuerpo irrelevante se usó como control negativo.

25 e) Efecto de Snail1 y la activación de PARP-1 en la formación de complejos SNAIL/PARP-1 en células A375. Las células A375 se trataron con KU- 0058949 (100 nM) durante 2 horas y después con 5 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (Peprotech) para estimular la vía de Snail1 o con agentes nocivos para el ADN (Doxorrubicina, 10  $\mu$ g/ml). Se hizo la inmunoprecipitación de PARP-1 y el Snail1 endógeno se analizó por western blot con un anticuerpo policlonal anti-Snail1 (abcam).

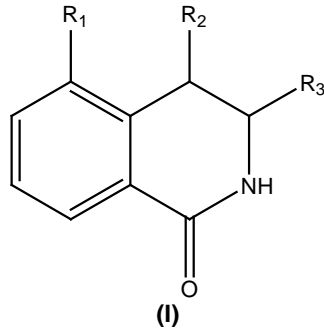
30 f) Mapeo de la asociación entre PARP-1 y Snail1 por experimentos de pulldown en células Cos1. Los complejos se unieron a Glutathione-Sepharose y se analizaron por western blot con anticuerpos anti-HA y GST. Todas las construcciones de GST fusión fueron publicadas previamente (Dantzer F, Giraud-Panis MJ, Jaco I, Ame JC, Schultiz I, Blasco M, Koering CE, Gilson E, Menissier-de Murcia J, de Murcia G, Schreiber V. Mol Cell Biol 24(4):1595-607, 2004).

35 g) Mapeo de los dominio c-terminal y N-terminal de SNAIL con hPARP-1. Las células Cos1 también se transfectaron con los dominios C- y N- terminal de SNAIL fusionados a GFP y con pBC-PARP-1. Los experimentos de pull down se hicieron y las interacciones se determinaron por western blot usando anticuerpos anti-GFP y anti-GST de Sigma Se hizo análisis por pulldown en células Cos1 y se analizó por western blot con anticuerpos para  
40 GFP y GST.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula general (I),

5

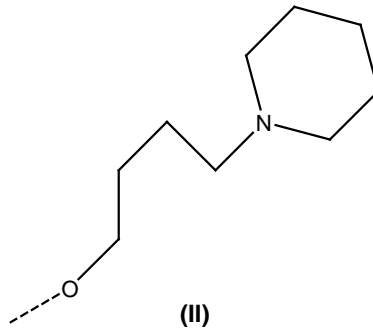


10

donde

R<sub>1</sub> se selecciona entre hidrógeno o un sustituyente de fórmula (II),

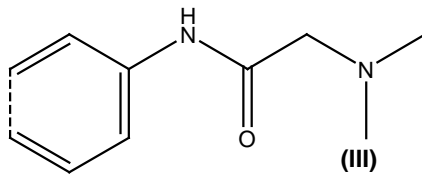
15



20

R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son hidrógeno o están unidos formando un sustituyente de fórmula (III),

25



o sus isómeros o solvatos

30

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o condición mediada por el factor de transcripción Snail-1, donde dicha enfermedad o condición es la metástasis pulmonar.

2. Uso del compuesto de fórmula general (I) según la reivindicación 1, donde R<sub>1</sub> es el sustituyente de fórmula (II).

3. Uso del compuesto de fórmula general (I) según la reivindicación 2, donde R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son hidrógeno.

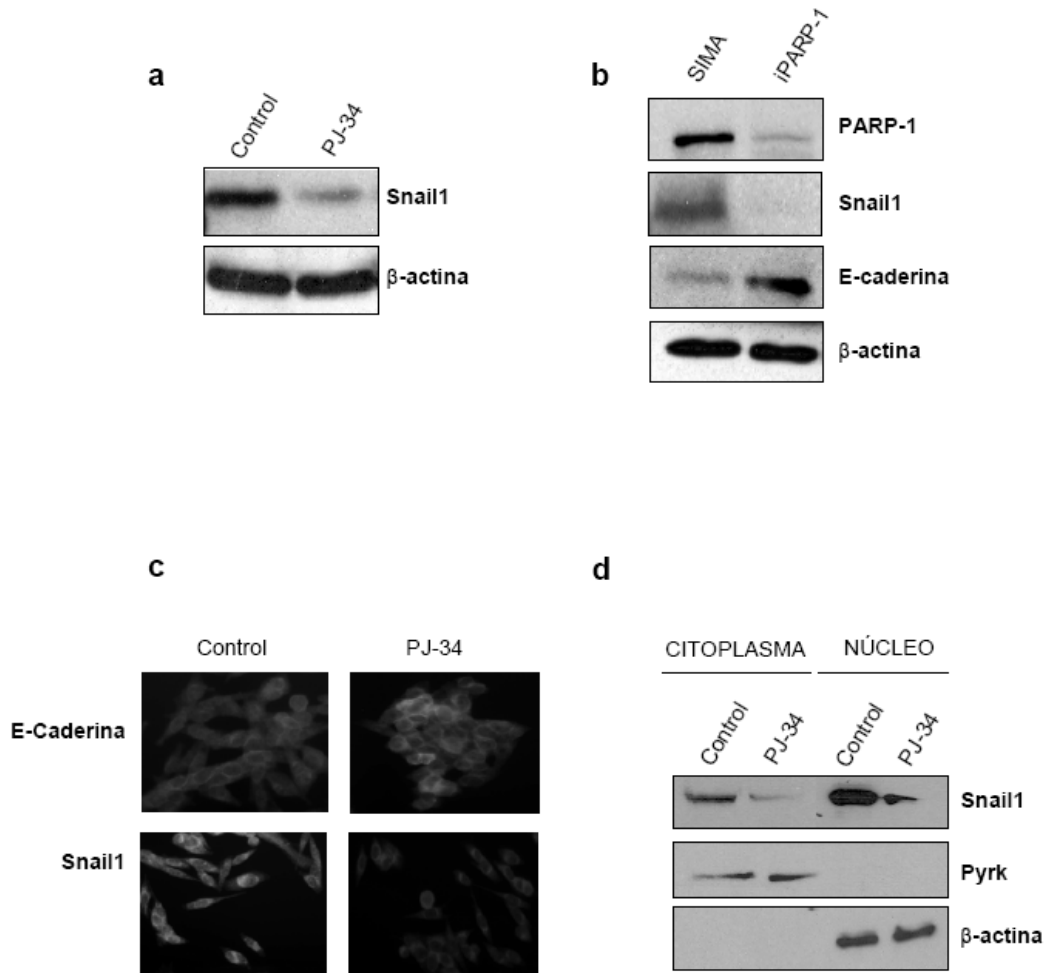
4. Uso del compuesto de fórmula general (I) según la reivindicación 1, donde R<sub>1</sub> es hidrógeno.

35

5. Uso del compuesto de fórmula general (I), según la reivindicación 4, donde R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> están unidos formando el sustituyente de fórmula (III).

6. Uso del compuesto de fórmula general (I) según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, como inhibidor del factor de transcripción Snail-1 en ensayos biológicos.





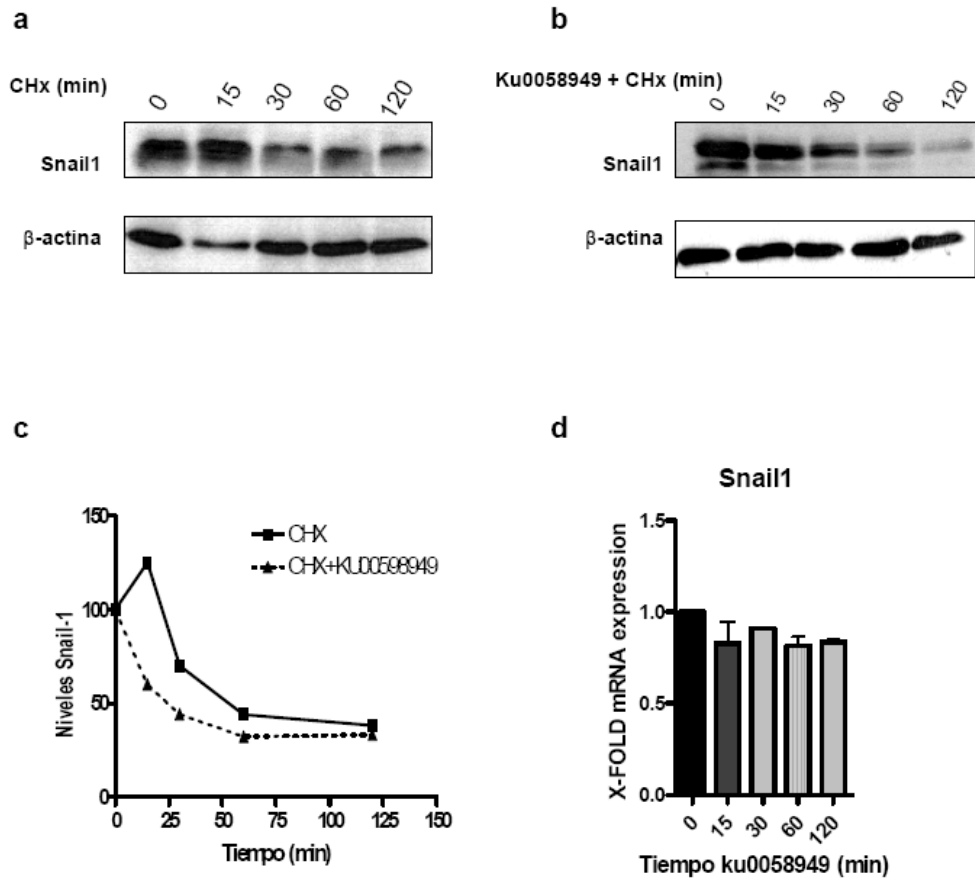


FIG. 2

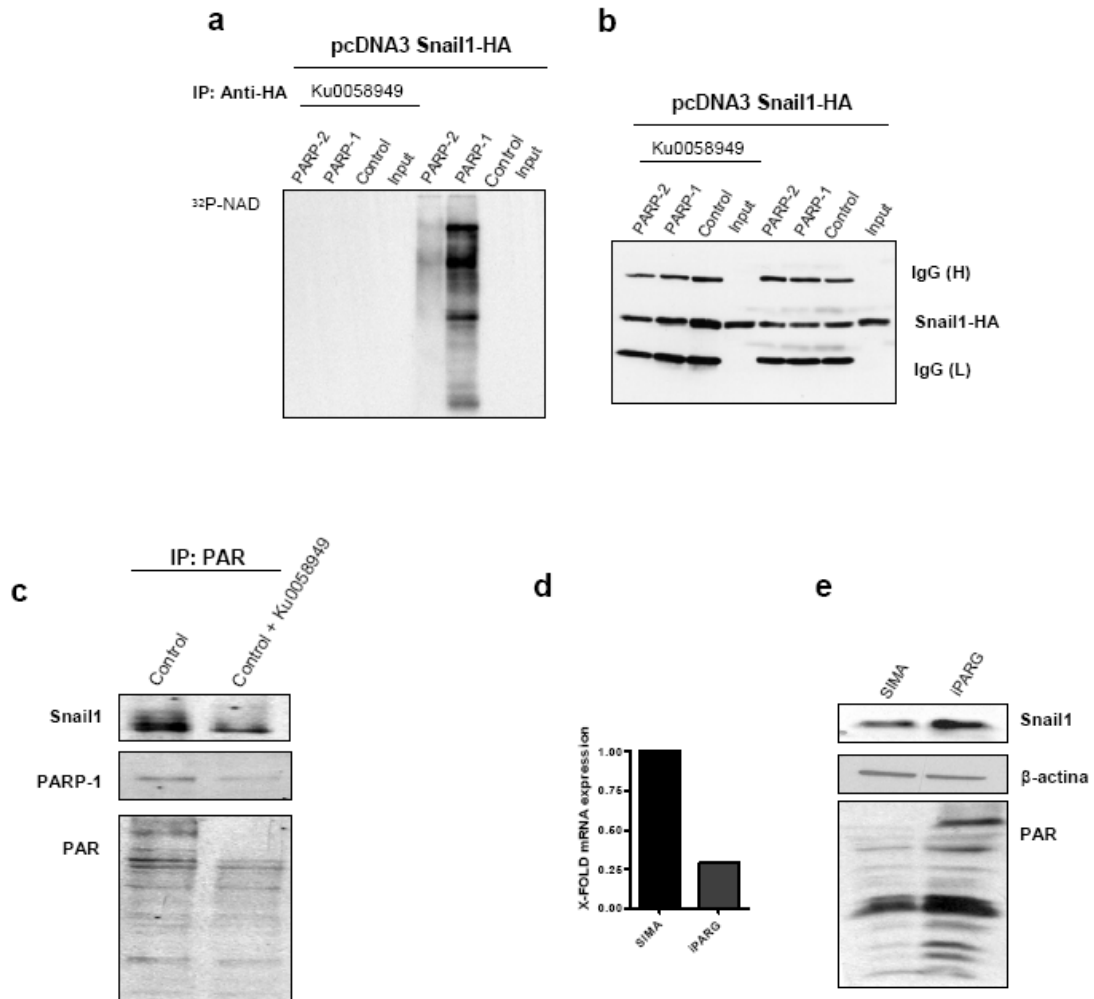


FIG. 3

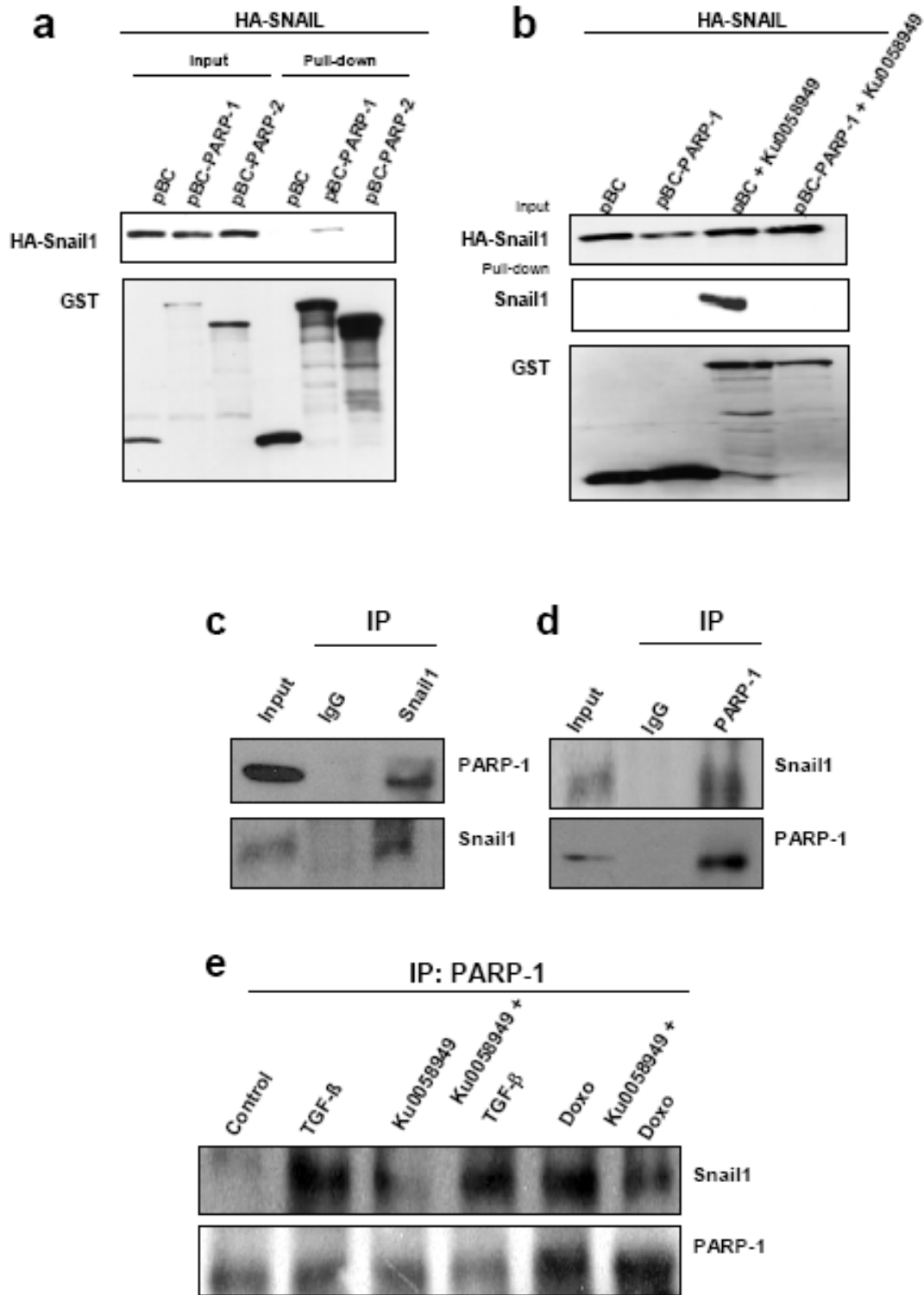
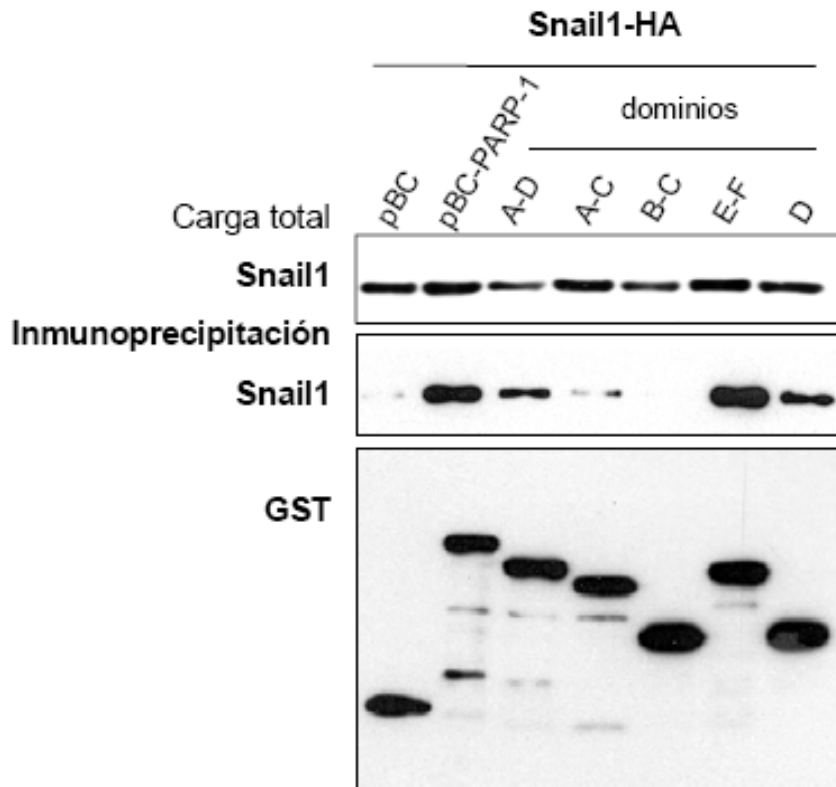
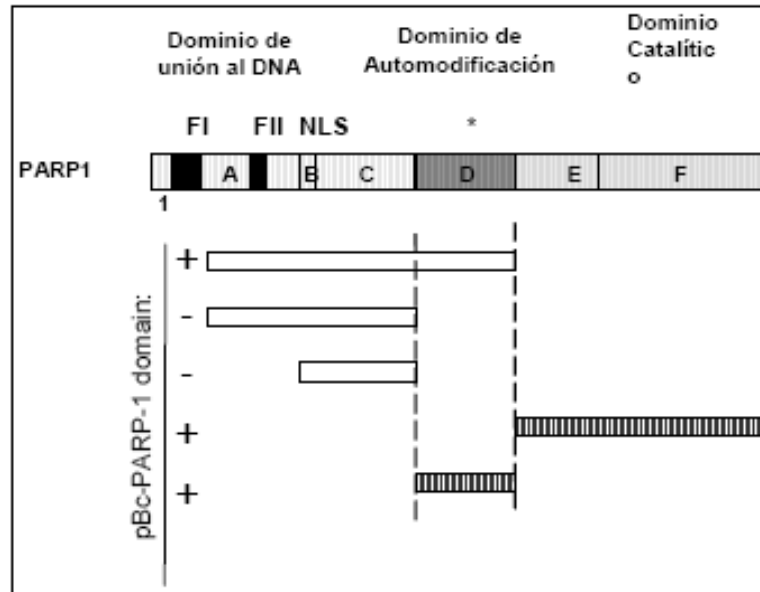


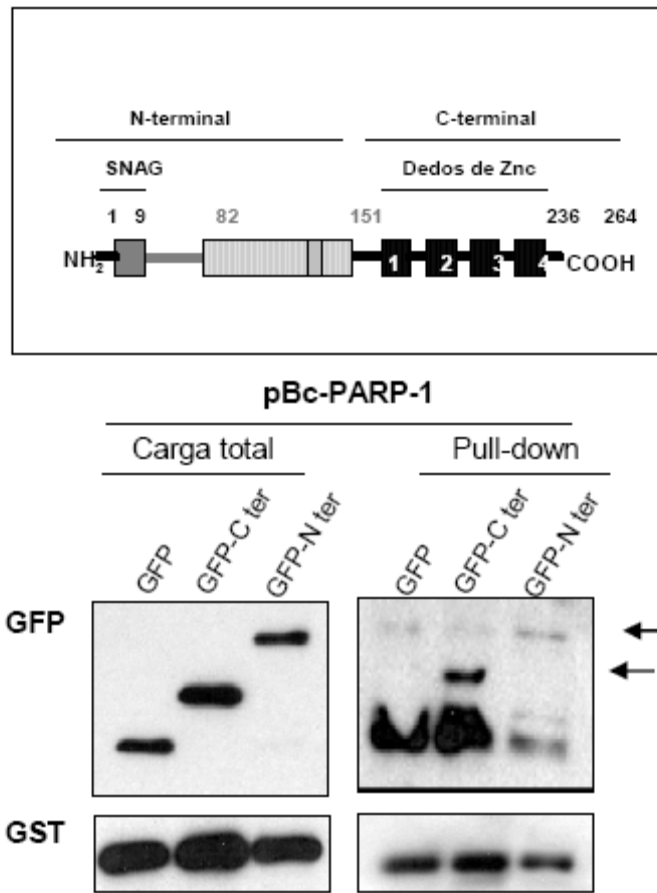
FIG. 4

**f**



**FIG. 4 (cont.)**

**g**



**FIG. 4 (cont.)**



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031844

②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.12.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X         | WO 2006050026 A2 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 11.05.2006, párrafo [0027],[0029-0030]; reivindicaciones.   | 1-6                        |
| X         | WO 2009047752 A1 (RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD.) 16.04.2009, página 3, líneas 10-15; página 8, línea 16 - página 9, línea 6.  | 1-6                        |
| A         | OLIVER POZO, J. "Regulation of SNAIL-1 by PARP-1 in metastatic melanoma". Seminario del CIC bioGUNE. Noviembre 2010 (12.11.2010).   | 1-6                        |
| A         | MOREE, W.J. et al. "Identification of ring-fused pyrazolo pyridin-2-ones as novel poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibitors". Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2008, Volumen 18, páginas 5126-5129. Ver página 5126, resumen; página 5127, figura 1, compuesto 3. | 1-6                        |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
21.02.2012

Examinador  
G. Esteban García

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K31/4704** (2006.01)

**A61K31/473** (2006.01)

**A61P35/04** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES,EPODOC,WPI,REGISTRY,CAPLUS,MEDLINE,BIOSIS,PUBMED,NPL,XPESP,EMBASE,CHEMSPIDER



Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.02.2012

**Declaración**

|   |                      |           |
|---|----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones     | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1-6 | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones     | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1-6 | <b>NO</b> |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|-------------------------------------|-------------------|
| D01       | WO 2006050026 A2                    | 11.05.2006        |
| D02       | WO 2009047752 A1                    | 16.04.2009        |

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención es el uso de un compuesto de fórmula general (I) con estructura de isoquinolona para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o condición mediada por el factor de transcripción Snail-1, como es la metástasis pulmonar.

El documento D01 divulga la utilidad de agentes que disminuyen la actividad del receptor endotelial B (ETRB), la actividad de BCL-2A1 y de polimerasa poli(ADP-ribosa) (PARP-3) para inhibir la proliferación y/o inducir la muerte celular de células tumorales (ver párrafo [0027]) y, por lo tanto, para el tratamiento del cáncer, incluyendo tumores sólidos y metástasis, como puede ser, cáncer de pulmón y melanoma metastásico (ver párrafos [0029]-[0030]). Entre los inhibidores de PARP-3 divulgados se encuentra la 3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxi]-1(2H)-isoquinolinona (compuesto (II) de la invención).

El documento D02 divulga el efecto letal del compuesto **PJ-34**, N-(6-oxo-5,6-fenantridin-2-il)-N,N-dimetilacetamida, (compuesto (III) de la invención) sobre las células de cáncer de mama (ver página 3, líneas 10-15), lo que lo hace útil para el tratamiento del cáncer, entendido como cualquier enfermedad neoplásica caracterizada por la división celular incontrolada, incluyendo metástasis, como puede ser el melanoma (ver página 8, línea 16-página 9, línea 6).

Los documentos citados D01 y D02 no divulgan la implicación del factor Snail-1 en los procesos tumorales asociados a la proliferación celular y la metástasis. Sin embargo, esta referencia al modo de actuación del compuesto (I) se considera un mero descubrimiento, por lo que no constituye una característica técnica diferencial del objeto de la invención respecto al estado de la técnica.

Por tanto, se considera que el objeto de la reivindicaciones **1-6** no es nuevo según lo divulgado en cada uno de los documentos D01 y D02 tomados por separado.