

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 396 115**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/4045** (2006.01)  
**A61K 31/405** (2006.01)  
**C07D 519/00** (2006.01)  
**C07D 519/04** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2008 E 08716083 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012 EP 2120929**

---

(54) Título: **Uso de inhibidores de la degradación de p27, en particular argirina y derivados de la misma, para el tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

**28.02.2007 EP 07004185  
22.08.2007 US 965932 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.02.2013**

(73) Titular/es:

**HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR  
INFEKTIONSFORSCHUNG GMBH (50.0%)  
INHOFFENSTRASSE 7  
38124 BRAUNSCHWEIG, DE y  
MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER  
(50.0%)**

(72) Inventor/es:

**MALEK, NISAR;  
SASSE, FLORENZ;  
NICKELEIT, IRINA;  
FRANK, RONALD;  
HINKELMANN, BETTINA y  
STEINMETZ, HEINRICH**

(74) Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 396 115 T3**

---

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de inhibidores de la degradación de p27, en particular argirina y derivados de la misma, para el tratamiento del cáncer

La presente invención se refiere al uso de macrociclos concretos que son inhibidores de la degradación proteasómica de p27, en particular argirina y derivados de la misma, preferentemente argirina A, para el tratamiento del cáncer, así como la derivatización de dichos macrociclos.

Las transiciones entre fases del ciclo celular son catalizadas por una familia de quinasas dependientes de ciclina (Cdk) (Nurse, 1990; Hartwell, 1991). En algunos organismos, las señales fisiológicas que controlan la transición de G2 a M apuntan a una serie de etapas que activan el Cdk, Cdc2. La activación de Cdc2 está regulada positivamente por la fosforilación en treonina 161 (Booher y Beach, 1986; Krek y Nigg, 1991; Gould y col., 1991; Solomon y col., 1990; 1992) y negativamente mediante fosforilación en tirosina 15 (Gould y Nurse, 1989). La replicación incompleta de ADN retrasa la desfosforilación de tyr-15 (Dasso y Newport, 1990; Smythe y Newport, 1992), y las mutaciones en Cdc2 que convierten la tyr-15 en un residuo no fosforilable son letales y producen una mitosis prematura (Gould y Nurse, 1989). De un modo similar, la sobreexpresión de la tyr-15 fosfatasa, Cdc25 (Enoch y Nurse, 1990; Kumagai y Dunphy, 1991), o la pérdida de las tyr-15 quinasas (Ludgren y col., 1991) sortean el requisito de que la replicación del ADN se complete antes de que comience la mitosis. Probablemente se requieran niveles de control para explicar completamente el bloqueo de la mitosis producido por la replicación continua del ADN (Sorger y Murray, 1992; Heald y col., 1993; Stueland y col., 1993). También existen pruebas de que la parada del ciclo celular inducida por los daños en el ADN puede estar relacionada con la inactivación de Cdc2 (Rowley y col., 1992; Walworth y col., 1993), pero se ha cuestionado el papel de la fosforilación de la tirosina en este contexto (Barbet y Carr, 1993).

Las células de mamífero, como levaduras, requieren quinasas dependientes de ciclina para la progresión a través de G1 y la entrada en la fase S (D'Urso y col., 1990; Blow y Nurse, 1990; Furukawa y col., 1990; Fang y Newport, 1991; Pagano y col., 1993; Tsai y col., 1993). Las ciclinas tanto de tipo D como E son limitantes de la velocidad para la transición de G1 a S y ambas reducen, pero no eliminan, el requisito de la célula de factores de crecimiento mitogénico (Ohtsubo y Roberts, 1993; Quelle y col., 1993).

La reducción de los niveles celulares del inhibidor de la ciclina quinasa p27<sup>Kip1</sup> con frecuencia se encuentra en muchos cánceres humanos y se correlacionan directamente con el pronóstico de los pacientes (Philipp-Staheli, J., Payne, S.R. y Kemp, C.J. p27(Kip1): regulation and function of a haplo-insufficient tumour suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res* 264, 148-68 (2001)). Específicamente, se ha demostrado que el recambio proteasómico dependiente de ubiquitina reduce la expresión de p27 en muchos cánceres humanos (Loda, M. y col., Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 3, 231-4 (1997)).

El documento US 5,688,665 describe una proteína que tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 27 kD y capaz de unirse a un complejo ciclina E-Cdk2, designado p27, y de inhibir la activación. Además se describen procedimientos de determinar si un agente es capaz de inhibir o potenciar específicamente la capacidad de la proteína p27 para inhibir la activación del complejo ciclina E-Cdk2. Asimismo, el documento US 6,355,774 divulga la proteína p27 así como un procedimiento para producir p27 en células cultivadas. También se proporcionan ensayos in Vitro para descubrir agentes que afecten a la actividad de p27. Además se proporcionan procedimientos de diagnóstico y tratamiento de trastornos hipoproliferativos.

Porter y col. (Porter PL, Barlow WE, Yeh IT, Lin MG, Yuan XP, Donato E, Sledge GW, Shapiro CL, Ingle JN, Haskell CM, Albain KS, Roberts JM, Livingston RB, Hayes DF. p27Kip1 and Cyclin E Expression and Breast Cancer Survival After Treatment With Adjuvant Chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Dec 6;98(23):1723-31.) describen que la expresión anormal de las proteínas reguladoras del ciclo celular p27(Kip1) (p27) pueden estar asociadas con la supervivencia y recaída del cáncer de mama. Una expresión menor de p27 se asoció con una peor supervivencia global y supervivencia sin enfermedad que la expresión de p27 mayor. La expresión menor de p27 parece estar asociada con un mal pronóstico, especialmente entre pacientes con tumores positivos a receptores de esteroides.

El documento WO 02/055665 del ejemplo 8 del mismo describe ensayos que se han usado para identificar la interacción de Skp2 y p27 *in vitro*. Los ensayos se describen como útiles para analizar compuestos que inhiban la proliferación celular. Los ensayos se pueden llevar a cabo en presencia o ausencia de moléculas, compuestos, péptidos y las moléculas identificadas por los ensayos se describen como fármacos potencialmente útiles como agentes terapéuticos contra el cáncer y trastornos proliferativos. No se describen moléculas específicas como se han identificado.

De un modo similar, el documento US 2006-35280 describe una rápida detección selectiva de grandes bibliotecas de compuestos usando un ensayo de fluorescencia resuelta con tiempo homogéneo para la identificación de inhibidores de la unión de Cks1-Skp2 que desempeña un papel crítico en la degradación dependiente de ubiquitina de p27.

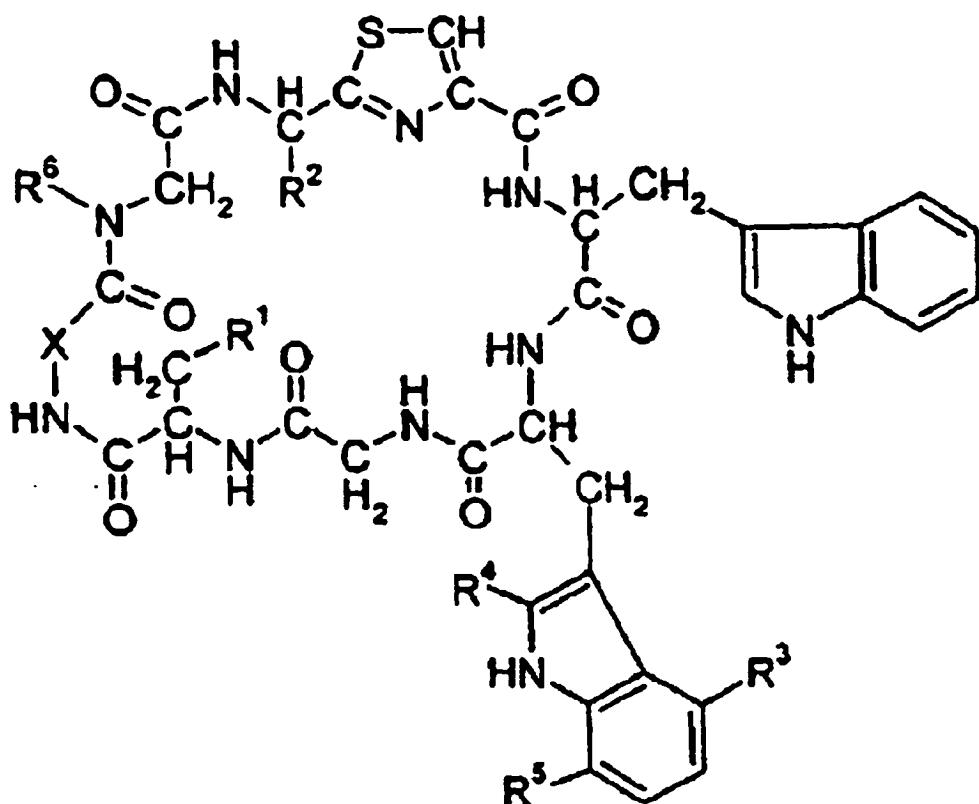
Pohl y col., (Pohl G, Rudas M, Dietze O, Lax S, Markis E, Pirker R, Zielinski CC, Hausmaninger H, Kubista E, Samonigg H, Jakesz R, Filipits M. High p27Kip1 expression predicts superior relapse-free and overall survival for premenopausal women with early-stage breast cancer receiving adjuvant treatment with tamoxifen plus goserelin. *J*

Clin Oncol. 2003 Oct 1;21(19):3594-600.) describen que una expresión alta de p27Kip1 predecía independientemente una supervivencia sin recaídas y una supervivencia global superiores en pacientes tratados con la terapia endocrina de combinación. Por tanto, la expresión alta de p27Kip1 puede ser útil para la selección de mujeres premenopáusicas con cáncer de mama positivo para receptor hormonal en estadio temprano para la terapia endocrina de combinación adyuvante.

El documento GB 2,367,553 divulga macrociclos farmacéuticamente activos y las respectivas preparaciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, la inducción de inmunotolerancia o el tratamiento de infecciones bacterianas.

Es un objeto de la presente invención proporcionar compuestos que se pueden usar y estrategias que se pueden perseguir con el fin de estabilizar p27, con el objetivo de usarlos como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades cancerosas.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, este objeto se resuelve mediante el uso de un compuesto de fórmula general I



(fórmula I)

en la que

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con OH o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R<sup>3</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> que está insustituido o sustituido con OH u OR, en el que R está seleccionado de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, arilo o acetilo,

R<sup>4</sup> es hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con OH o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R<sup>5</sup> es hidrógeno o halógeno;

R<sup>6</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; y

X es C=CH<sub>2</sub> o CHR<sup>7</sup> en el que R<sup>7</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con -S-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y sus sales farmacéuticamente aceptables,

para la producción de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto.

Se prefiere el uso de acuerdo con la presente invención, en el que

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son, de forma independiente, hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con OH o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R<sup>4</sup> es hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con OH o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R<sup>5</sup> es hidrógeno o halógeno;

$R^6$  es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; y

X es C=CH<sub>2</sub> o CHR<sup>7</sup> en el que R<sup>7</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con -S-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y sus sales farmacéuticamente aceptables, para la producción de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto.

- 5 Se entenderá que los compuestos definidos anteriormente pueden llevar sustituyentes dentro de su estructura, por ejemplo pueden llevar sustituyentes de restos amino adecuados.

Los grupos y restos alquilo en los compuestos de fórmula I pueden ser de cadena lineal o ramificada. Los grupos alquilo son, adecuadamente, de cadena lineal.

También se prefiere el uso de acuerdo con la presente invención, en el que

10 R<sup>1</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> insustituido, por ejemplo metilo;

R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con OH, por ejemplo metilo o hidroximetilo;

R<sup>3</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, por ejemplo metoxi;

R<sup>4</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> insustituido, por ejemplo metilo;

R<sup>5</sup> es hidrógeno o bromo;

15 R<sup>6</sup> es hidrógeno o metilo; y

X es C=CH<sub>2</sub> o CHR<sup>7</sup> en el que R<sup>7</sup> es metilo que está insustituido o sustituido con -S-etilo y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Incluso más preferido es un uso de acuerdo con la presente invención, en el que

20 R<sup>1</sup> es hidrógeno o metilo;

R<sup>2</sup> es metilo o hidroximetilo;

R<sup>3</sup> es hidrógeno o metoxi;

R<sup>4</sup> es hidrógeno o metilo;

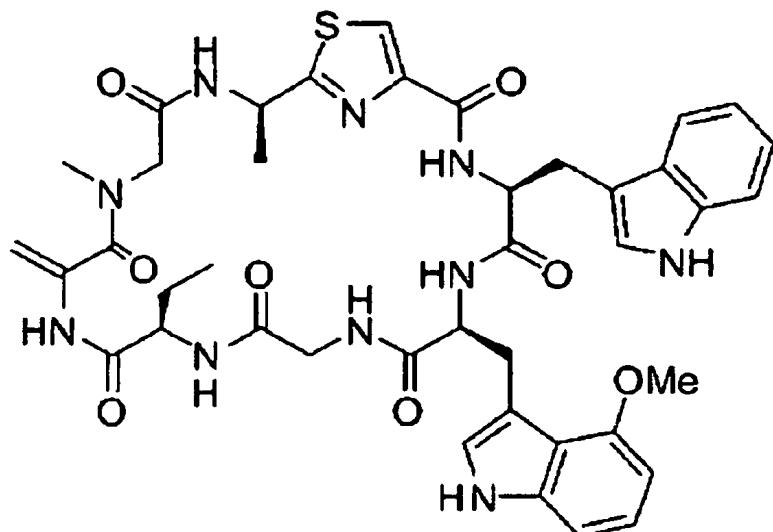
R<sup>5</sup> es hidrógeno;

R<sup>6</sup> es metilo; y

25 X es C=CH<sub>2</sub>,

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Se prefiere un uso de acuerdo con la presente invención que comprende proporcionar argirina A y sales farmacéuticamente aceptable de la misma a un paciente que lo necesite. Más particularmente preferida es argirina B



- 30 o, en particular, argirina F, y las sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

Para argirinas se aplican las definiciones siguientes (R<sup>5</sup> es H y R<sup>6</sup> es Me)

Argirina	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
A	H	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
B	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
C	H	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
D	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
E	H	CH <sub>3</sub>	H	H
F	H	CH <sub>2</sub> OH	OCH <sub>3</sub>	H
G	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	OCH <sub>3</sub>	H
H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H

Se prefiere un uso de acuerdo con la presente invención, en el que el sujeto es un mamífero, en particular un ser humano.

Sasse F y col., (en Sasse F, Steinmetz H, Schupp T, Petersen F, Memmert K, Hofmann H, Heusser C, Brinkmann V, von Matt P, Hofle G, Reichenbach H. Argyrins, immuno-suppressive cyclic peptides from myxobacteria. I. Production, 5 isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)*. 2002 Jun;55(6):543-51.) describen la

producción de un grupo de péptidos cíclicos denominados argirinas, así como algunas de sus propiedades biológicas. No se menciona el cáncer. Vollbrecht y col., (in Vollbrecht L, Steinmetz H, Hofle G, Oberer, L, Rihs G, Bovermann G, y von Matt P. Argyrins, immuno-suppressive cyclic peptides from myxobacteria. II. Structure elucidation and stereochemistry. *J Antibiot (Tokyo)*. 2002 Aug;55(8):715-721.) describen la estructura de dichos péptidos cíclicos. 10

De un modo similar, Ley y col., (en Ley SV, Priour A, Heusser C. Total synthesis of the cyclic heptapeptide Argyrin B: a new potent inhibitor of T-cell independent antibody formation. *Org Lett*. 2002 Mar 7;4(5):711-4.) describen la síntesis de argirina B y su función como inhibidor de la formación de anticuerpos. Tampoco se menciona el cáncer.

Más preferido es un uso de acuerdo con la presente invención en el que el tratamiento de los trastornos 15 proliferativos y/o el cáncer comprende bloquear el crecimiento de las células tumorales y/o destruir la vasculatura tumoral existente, el tratamiento del cáncer de mama, el tratamiento del carcinoma hepatocelular, el tratamiento del carcinoma cervical, el tratamiento del carcinoma pulmonar, el tratamiento del mieloma múltiple y/o el tratamiento del cáncer de colon.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona a un uso de acuerdo con la presente invención, en el que el 20 medicamento comprende además ingredientes antitumorales adicionales farmacéuticamente activos, tales como paclitaxel.

Experimentos preliminares con ratones como los realizados por los presentes inventores muestran que la argirina es ya activa a una concentración de 0,03 mg/kg de peso corporal. Por tanto, otro aspecto de la presente invención se 25 refiere a un uso de acuerdo con la presente invención, en el que el compuesto, tal como, por ejemplo, argirina A o F, se administra a una dosis de 0,01 mg a 200 mg/kg, preferentemente a una dosis de 0,01 mg a 100 mg/kg, más preferentemente a una dosis de 0,02 mg a 10 mg/kg, administrado óptimamente al día. Otro ejemplo es 0,15 mg de argirina por kilogramo de peso corporal inyectados por vía intraperitoneal cada tres días.

En ciertas realizaciones de la invención, la administración se puede diseñar para que tenga como resultado 30 exposiciones secuenciales al compuesto durante algún periodo de tiempo, por ejemplo horas, días, semanas, meses o años. Esto se puede conseguir mediante administraciones repetidas del compuesto, por ejemplo mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente o, como alternativa, mediante un sistema de liberación controlada en el que el compuesto se libera en el sujeto durante un periodo prolongado sin administraciones repetidas. Mediante un sistema de liberación controlada se quiere decir que la liberación total del compuesto no se produce inmediatamente 35 tras su administración sino que se retrasa algún tiempo. La liberación se puede producir en ráfagas o se puede producir de forma gradual o continua. La administración de dicho sistema puede ser mediante, por ejemplo, formas de dosificación oral de acción prolongada, inyecciones en bolo, parches transdérmicos o implantes subcutáneos. Ejemplos de sistemas en los que la liberación se produce en ráfagas incluyen, por ejemplo, sistemas en los que el 40 compuesto está atrapado en liposomas que están encapsulados en una matriz polimérica, siendo los liposomas sensibles a un estímulo específico, por ejemplo temperatura, pH, luz, campo magnético, o una enzima de degradación, y sistemas en los que el compuesto está encapsulado mediante una microcápsula revestida iónicamente con una microcápsula con enzima de degradación en el núcleo. Ejemplos de sistemas en los que la liberación del compuesto es gradual y continua incluyen, por ejemplo, sistemas erosionables en los que el compuesto está contenido en una forma dentro de una matriz, y sistemas difusionales en los que el compuesto lo 45 atraviesa a una velocidad controlada, por ejemplo a través de un polímero. Dichos sistemas de liberación sostenida pueden estar, por ejemplo, en forma de pellas o cápsulas.

El compuesto se puede administrar antes o después de la aparición de síntomas de enfermedad. En ciertas realizaciones, el compuesto se administra a pacientes con historiales familiares de la enfermedad o que tienen fenotipos que pueden indicar una predisposición a la enfermedad, por ejemplo cáncer de mama, o que han sido diagnosticados con un genotipo que predispone al paciente a la enfermedad o que tienen otros factores de riesgo.

50 El compuesto de acuerdo con la invención se administra al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por cantidad terapéuticamente eficaz se quiere decir que la cantidad que es capaz de prevenir al menos parcialmente o invertir la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar en base individual y se basará, al menos en parte, en la consideración de la especie de sujeto, el tamaño del sujeto, la edad del sujeto, la eficacia del compuesto concreto usado, la longevidad del compuesto concreto usado, el tipo de sistema de liberación usado, el 55 momento de administración con respecto al inicio de los síntomas de enfermedad y si se emplea o no un régimen de dosis única, múltiple o de liberación controlada. Un experto en la técnica puede determinar una cantidad terapéuticamente eficaz usando dichos factores y usando no más que experimentación de rutina.

En ciertas realizaciones preferidas, la concentración del compuesto es a una dosis de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1.000 mg/kg de peso corporal/día, más preferentemente a aproximadamente 0,01 mg a 200 mg/kg, preferentemente a una dosis de aproximadamente 0,01 mg a 100 mg/kg, más preferentemente a una dosis de aproximadamente 0,02 mg a 10 mg/kg. Preferentemente, la forma de dosificación es tal que no afecta sustancialmente perjudicialmente al sujeto.

Los compuestos de la invención también se pueden administrar por vía sistémica o tópica, por cualquier vía convencional, en particular por vía enteral, por ejemplo oral, por ejemplo en forma de comprimidos o cápsulas, parenteral, por ejemplo en forma de soluciones o suspensiones inyectables, tópica, por ejemplo en forma de lociones, geles, pomadas o cremas, o en forma nasal o de un supositorio.

- 10 Los compuestos de fórmula I y derivados de los mismos se pueden preparar sintéticamente mediante procedimientos conocidos para el experto en la técnica de la química peptídica, por ejemplo mediante un procedimiento que comprende la formación de anillos de un oligopéptido adecuado o, como alternativa, se pueden aislar del caldo de cultivo de un microorganismo adecuado. La preparación puede incluir una etapa de modificación adicional, por ejemplo hidratación de un doble enlace exocíclico, una etapa de reacción de adición o una etapa de halogenación. Se puede identificar un microorganismo adecuado cultivando diversos microorganismos diferentes, por ejemplo seleccionados del grupo de mixobacterias y sometiendo a detección selectiva los caldos de cultivo resultantes para detectar la presencia de un compuesto de fórmula I, en concreto de un compuesto de fórmula I en el que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, y R<sup>4</sup> son, de forma independiente, hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con OH, o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; R<sup>5</sup> es hidrógeno; y X es C=CH<sub>2</sub>.
- 20 El aislamiento puede seguir procedimientos conocidos habitualmente por el experto. Un abordaje adecuado puede comprender, por ejemplo, cultivar los microorganismos en presencia de una fase sólida, por ejemplo una resina, por ejemplo amberlite, adsorber el compuesto de fórmula I y eluir el compuesto de fórmula I de la fase sólida.

En el presente documento también se divulga un procedimiento para la detección selectiva de un compuesto de la capacidad para inhibir la degradación de p27, que comprende poner en contacto una célula con un compuesto del que se sospecha que inhibe la degradación de p27, analizar los contenidos de la célula para determinar la cantidad y/o la actividad biológica de p27 y/o el estado del ciclo celular y comparar la cantidad determinada y/o la actividad biológica de p27 o el estado del ciclo celular hallado sin el compuesto, en el que un cambio de dicha cantidad y/o la actividad biológica de p27 o el estado del ciclo celular es indicativo de que un compuesto inhibe la degradación de p27.

- 30 El experto en la técnica conoce bien los procedimientos de análisis de los contenidos de la célula que se pone en contacto con el compuesto que se va a someter a detección selectiva con el fin de determinar la cantidad y/o la actividad biológica de p27 y/o el estado del ciclo celular e incluyen transferencias de tipo Western para p27, el análisis de la expresión de p27 (p. ej., por medio de rtPCR) y el análisis de una proteína de fusión, tal como, por ejemplo, p27-GFP (proteína fluorescente verde), así como el análisis de los marcadores de ciclo celular. En el presente documento también se divulga un procedimiento en el que se determina la cantidad de p27 GFP.

El compuesto sometido a detección selectiva influye sobre la degradación proteasómica de p27 como se determina mediante la cantidad de una proteína de fusión, tal como p27-GFP.

La célula de ensayo investigada es una célula tumoral o línea celular tumoral, tal como una línea celular de cáncer de mama, una línea celular de carcinoma hepatocelular, una línea celular de carcinoma de cerviz, una línea celular de carcinoma pulmonar y/o una línea celular de cáncer de colon.

El procedimiento comprende además una modificación química del compuesto como se ha identificado. En este caso, el compuesto como se ha seleccionado funcionará como una denominada "estructura principal", que además se somete a modificaciones químicas que después se someten a detección selectiva por su eficacia para incrementar la cantidad y/o la actividad biológica de p27 en uno o más procedimientos de detección selectiva adicionales como se ha indicado en lo que antecede.

La modificación se puede efectuar mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, sin limitaciones, la introducción de nuevas cadenas laterales o el intercambio de grupos funcionales como, por ejemplo, introducción de halógenos, en particular F, Cl o Br, la introducción de grupos de alquilo inferior, que tengan, preferentemente, de uno a cinco átomos de carbono como, por ejemplo, grupos metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-pentilo o isopentilo, grupos de alquenilo inferior, que tengan, preferentemente, de uno a cinco átomos de carbono, grupos de alquinilo inferior, que tengan, preferentemente, de uno a cinco átomos de carbono o mediante la introducción de, por ejemplo, un grupo seleccionado del grupo consistente en un grupo NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, OH, SH, NH, CN, arilo, heteroarilo, COH o COOH. Además, se podrían añadir a la molécula grupos peptídicos adicionales, tales como aminoácidos sencillos, dipéptidos, tripéptidos y así sucesivamente.

55 En caso necesario, las etapas de seleccionar el compuesto, modificar el compuesto y medir el efecto de los compuestos modificados sobre la proteína se pueden repetir una tercera vez o un número dado de veces, según sea necesario. El procedimiento descrito en lo que antecede también se denomina "evolución dirigida", ya que implica una multitud de etapas que incluye modificación y selección, de modo que los compuestos eficaces se seleccionan

en un procedimiento "evolucionario" que optimiza sus capacidades con respecto a una propiedad concreta, es decir para estabilizar el p27.

Se prefiere un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que un compuesto de acuerdo con la fórmula I como anteriormente, en el que R1, R2 y R3 son, de forma independiente, hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con OH, o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; R4 es hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con OH, o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; R5 es hidrógeno o halógeno; R6 es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; y X es C=CH<sub>2</sub> o

5 CHR6 en los que R6 es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con S-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, y sus sales farmacéuticamente aceptables, está modificado químicamente, es decir se usa como estructura principal para la "evolución dirigida".

10 En el presente documento también se divulga un procedimiento para producir una composición farmacéutica que comprende (a) procedimiento(s) de detección selectiva de acuerdo con la presente invención y formular el compuesto sometido a detección selectiva con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos, excipientes y estrategias para formular una composición farmacéutica para, por ejemplo, administrar por vía sistémica o tópica, por cualquier vía convencional, en particular por vía enteral, por ejemplo oral, por ejemplo en forma de comprimidos o cápsulas, parenteral, por ejemplo en forma de soluciones o suspensiones inyectables, 15 tópica, por ejemplo en forma de lociones, geles, pomadas o cremas, o en forma nasal o de un supositorio son bien conocidos para el experto en la técnica y se describen en la literatura respectiva.

20 La administración de un agente, por ejemplo un compuesto, se puede conseguir por cualquier procedimiento que permite que el agente alcance las células diana. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, inyección, depósito, implantación, supositorios, ingestión oral, inhalación, administración tópica o cualquier otro procedimiento de administración en el que se consigue que el agente acceda a las células diana. Las inyecciones pueden ser, por ejemplo, intravenosas, intradérmicas, subcutáneas, intramusculares o intraperitoneales. La implantación incluye insertar sistemas de liberación de fármaco implantables, por ejemplo microesferas, hidrogeles, depósitos poliméricos, matrices de colesterol, sistemas poliméricos, por ejemplo sistemas de erosión en matriz y/o difusión y 25 sistemas no poliméricos, por ejemplo pellas comprimidas, condesadas o parcialmente condensadas. Los supositorios incluyen supositorios de glicerina. Las dosis para ingestión oral pueden estar recubiertas entéricamente. La inhalación incluye administrar el agente con un aerosol en un inhalador, bien solo o unido a un vehículo que se pueda absorber. El agente se puede suspender en líquido, por ejemplo en forma disuelta o coloidal. El líquido puede ser un disolvente, un disolvente parcial o no ser disolvente. En muchos casos se puede usar agua o un líquido 30 orgánico.

Otro aspecto más de la presente invención está dirigido a una composición farmacéutica que se produce de acuerdo con el procedimiento anterior.

35 Otro aspecto de la presente invención también proporciona un procedimiento para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que necesite tal tratamiento una cantidad eficaz de la preparación farmacéutica de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, dicho cáncer se selecciona de cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de pulmón y cáncer de colon o trastornos proliferativos. Preferentemente, dicho paciente es un ser humano. Con tratar se quiere decir incluir, por ejemplo prevenir, tratar, 40 reducir los síntomas de la enfermedad o afección o curar la enfermedad o afección.

45 La invención también incluye un procedimiento para tratar un sujeto en riesgo de una enfermedad como anteriormente, en el que se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto como se ha indicado anteriormente. Estar en riesgo de la enfermedad puede ser el resultado de, por ejemplo, un historial familiar de la enfermedad, un genotipo que predispone a la enfermedad o síntomas fenotípicos que predisponen a la enfermedad.

50 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un uso como anteriormente, en el que el medicamento comprende además ingredientes farmacéuticamente activos adicionales que modulan el cáncer, tal como cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de pulmón y cáncer de colon.

55 Recientemente, los inventores han demostrado que la expresión de una versión estabilizada de p27<sup>kip1</sup> (p27<sup>kip1</sup>T187A) en un ratón modificado genéticamente reducía significativamente el número de pólipos adenomatosos intestinales que progresaban a carcinomas invasivos (Timmerbeul, I. y col., Testing the importance of p27 degradation by the SCFskp2 pathway in murine models of lung and colon cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 14009-14 (2006)). En base a este trabajo, los inventores establecen la identificación de compuestos que conducen a una reexpresión de p27 en tejidos cancerosos. En este trabajo, los inventores identificar la argirina A, un compuesto derivado de la mixobacteria *archangium gephyra*, como potente inductor de la expresión de p27<sup>kip1</sup>. La argirina A induce apoptosis en líneas celulares de cáncer humano y xenoinjertos tumorales *in vivo*. Es importante el hecho de que induciendo p27<sup>kip1</sup> también se apunta a la vasculatura tumoral existente, lo que conduce a la destrucción del tejido tumoral *in vivo*. Las funciones de la argirina A dependen estrictamente de la expresión de p27<sup>kip1</sup>, ya que ni las células tumorales ni las células endoteliales que no expresan p27<sup>kip1</sup> responden a este compuesto. Sorprendentemente, el mecanismo molecular por el cual la argirina A ejerce su función biológica dependiente de p27 es a través de una potente inhibición del proteasoma 20S.

Para identificar sustancias que conducen a un incremento de los niveles de expresión de p27<sup>kip1</sup>, los inventores han generado un sistema de ensayo de alto rendimiento basado en células (véanse los detalles en materiales y procedimientos). Una de las sustancias que ejercía el incremento más fuerte en la fluorescencia se identificó como argirina A, un péptido cíclico que originalmente se identificó como producto metabólico derivado de la mixobacteria *archangium gephyra* (Sasse, F. y col., Argyrins, immunosuppressive cyclic peptides from myxobacteria. I. Production, isolation, physicochemical and biological properties. J Antibiot (Tokyo) 55, 543-51 (2002) Figura 5A). Como se muestra en citometría de flujo, la argirina A ejerció dos fenotipos celulares diferentes a intervalos de CI<sub>50</sub>. Aunque los fibroblastos humanos primarios, A549 (cáncer de pulmón) y las células de carcinoma de colon HCT116 dejaron de proliferar, las líneas celulares de carcinoma de colon SW480, CaCo así como las células MCF7 (cáncer de mama) y HeLa (cáncer de cuello uterino) sufrieron apoptosis, como se muestra mediante el espectacular incremento de la fracción en la fase subG1. La actividad inductora de apoptosis de la argirina A se confirmó midiendo la fragmentación del ADN usando un ELISA de fragmentación de histonas (Figura 5B).

El experimento del curso del tiempo mostrado en la Figura 1B muestra que la argirina A inducía un incremento de los niveles celulares de p27<sup>kip1</sup> en las células de carcinoma de colon SW480 y HCT116 y en las células HeLa. Para determinar si el cambio inducido por Argirina A en los niveles de expresión de p27<sup>kip1</sup> se debía a un incremento de su estabilidad, los inventores midieron la semivida de p27<sup>kip1</sup> en las células HeLa y SW480 en presencia y ausencia de argirina A. La Figura 1C muestra una cuantificación de los niveles de expresión de p27<sup>kip1</sup> en comparación con la actina en células tratadas con cicloheximida que se incubaron con argirina A o se dejaron sin tratar. El tratamiento con argirina A tiene como resultado un bloqueo completo del recambio de p27 en estas células. Como todos los mecanismos de recambio de p27 implican la destrucción proteolítica de la proteína mediante el proteasoma 20S, después los inventores midieron la actividad de los proteasomas humanos purificados tras la incubación con cantidades crecientes de argirina A. La figura 1D muestra que la incubación del proteasoma 20S humano purificado con argirina A conducía a una inhibición dependiente de la dosis de las actividades del proteasoma de tipo caspasa, tripsina y quimotripsina. Es importante que la extensión de la inhibición del proteasoma por la argirina A era comparable a la que se midió con el inhibidor de proteasoma clínicamente usado bortezomib (Velcade) *in vitro*. De acuerdo con la capacidad de la argirina A para inhibir el proteasoma, los inventores encontraron que otros sustratos conocidos del proteasoma, es decir p53, p21, BAX and NfK $\beta$ , también se acumulaban en la respuesta al tratamiento de la argirina A (Figura 1E). Por tanto, los inventores han concluido que la argirina A evita la degradación de p27 debido a su actividad inhibidora del proteasoma *in vivo* e induce la apoptosis o detienen en G1 en varias de diferentes líneas celulares tumorales.

Después, los inventores analizaron si la estabilización de p27 era de verdad necesaria para la función inductora de apoptosis de la argirina A o era simplemente una consecuencia de la inhibición del proteasoma. Para esto, los inventores trataron fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados de ratones silvestres con p27<sup>kip1</sup> o defectivos en p27<sup>kip1</sup> con argirina A o el inhibidor del proteasoma bortezomib y sometieron a ensayo la distribución y apoptosis del ciclo celular mediante citometría de flujo. El tratamiento con Bortezomib indujo la apoptosis tras 24 horas en ambas líneas celulares con independencia del estado de p27<sup>kip1</sup>. La Figura 2A muestra una cuantificación de las fracciones subG1 en MEF silvestres con p27 y defectivos en p27 (véase también la Figura 6A). La misma respuesta se observó con el tratamiento con MG 132. En fuerte contraste, el tratamiento con argirina A indujo apoptosis sólo en las células que expresaban p27<sup>kip1</sup>, mientras que solo el diez por ciento de los fibroblastos defectivos en p27<sup>kip1</sup> sufrieron muerte celular apoptótica tras 60 horas de tratamiento. Estas diferencias en sensibilidad en respuesta al tratamiento con argirina A no se debían a las diferencias en la acumulación de otros sustratos proteasómicos en células silvestres y defectivas en p27 a medida que los niveles de p53 y de p21 aumentaban en ambas líneas celulares en respuesta a la argirina A (Figura 6B). Para ampliar esta observación a las células cancerosas humanas, los inventores redujeron los niveles de p27<sup>kip1</sup> en células HeLa usando ARNsi específico de p27<sup>kip1</sup>. Como se muestra en la Figura 2f, las células HeLa que expresan p27<sup>kip1</sup> experimentaron apoptosis en respuesta a la argirina A, mientras que el tratamiento con p27siRNA bloqueó completamente la función de inducción de apoptosis de este compuesto.

El análisis de los inventores muestran que mientras que ambos inhibidores del proteasoma argirina A y bortezomib son capaces de bloquear la actividad del proteasoma *in vitro* sólo la argirina A requiere expresión de p27<sup>kip1</sup> para inducir muerte celular. Por tanto, los inventores decidieron analizar directamente la extensión a la cual los efectos celulares de la inhibición del proteasoma se están influidos por la expresión de p27<sup>kip1</sup>. Para esto, los inventores diseñaron moléculas de ARNsi específicas dirigidas a las subunidades β1 (actividad de tipo caspasa), β2 (actividad de tipo tripsina) and β5 (actividad de tipo quimotripsina) del proteasoma 20S de ratón. A continuación, los inventores redujeron la expresión de estas subunidades en fibroblastos embrionarios derivados de células silvestres o defectivas en p27<sup>kip1</sup> y midieron la actividad del proteasoma y la distribución del ciclo celular. Las Figuras 2B y 2D muestran las mediciones de actividad para las actividades de tipo caspasa, quimotripsina y tripsina del proteasoma tras el tratamiento con argirina A o una combinación de ARNsi contra las subunidades β1, β2 y β5. Los niveles de expresión de la subunidad del proteasoma se muestran en las correspondientes transferencias de tipo western. El grado de inhibición que alcanzaron los inventores con detención mediada por el ARNsi de las subunidades proteasómicas fue comparable a los efectos ejercidos por el tratamiento de la argirina A o bortezomib *in vivo* (Figura 3A). Los niveles de expresión de la subunidad del proteasoma se muestran en las correspondientes transferencias de tipo western.

La pérdida de actividad proteasómica en los fibroblastos silvestres condujo a la inducción de la apoptosis en el 38 % (argirina A) o el 45 % (ARNsi) de todas las células tras 24 horas (Figura 2C). Es importante el hecho de que sólo el 5

% (argirina A) o el 6 % (ARNsi) de todos los fibroblastos derivados de ratones defectivos en p27 sufrieron apoptosis a niveles comparables de inhibición del proteasoma (Figura 2E), mientras que el tratamiento de las células silvestres o defectivas en p27 con apoptosis masiva inducida por bortezomib independiente del estado de p27 (Figura 2A). Estos resultados apuntan hacia un papel todavía no reconocido de p27<sup>kip1</sup> como regulador crítico de la muerte celular apoptótica en respuesta a la inhibición del proteasoma.

Los inventores decidieron comparar las respuestas celulares de células tratadas con argirina A o bortezomib directamente. Con este fin, los inventores determinaron la firma de la expresión génica de las células MCF7 en respuesta a la argirina A o a bortezomib y compararon los perfiles de expresión génica resultantes. La Figura 8C muestra un gráfico de correlación de los datos de la expresión génica obtenidos por los inventores en estos experimentos usando células MCF7 sin tratar y tratadas con argirina A o bortezomib. La Figura 6D muestra los valores de correlación. Como se muestra en la Figura 2G, los perfiles de expresión génica de las células MCF7 que se trataron con bortezomib o argirina A difieren espectacularmente. Mientras que el tratamiento con bortezomib condujo a cambios en la expresión de más de 10.900 genes, solo aproximadamente 500 genes cambiaron en respuesta al tratamiento con argirina A. Entre estos genes, 311 se vieron afectados por bortezomib y por argirina A, respectivamente. El agrupamiento genómico funcional basado en sus términos de ontología génica correspondientes indica que aunque tanto la argirina A como el bortezomib inhiben el proteasoma 20S, producen perturbaciones muy divergentes a nivel celular. A partir de estos datos, los inventores concluyen que el tratamiento con bortezomib afecta a dianas adicionales en la célula que tienen como resultado la activación de varias respuestas celulares, de modo que hace que la muerte celular inducida por bortezomib sea independiente de la expresión de p27<sup>kip1</sup>.

Recientemente, los inventores han demostrado que la estabilización de p27<sup>kip1</sup> previene la progresión de pólipos adenomatosos a cánceres intestinales invasivos. Por tanto, los inventores han analizado si la estabilización de p27<sup>kip1</sup> inducida por argirina A sería beneficiosa en el tratamiento de los xenoinjertos tumorales derivados de células de cáncer de colon humano. Para analizar esto, los inventores analizaron primero si la argirina A era activa tras la aplicación *in vivo*. Tras la inyección intraperitoneal de argirina A se aisló el proteasoma 20S de linfocitos de sangre periférica a diferentes puntos de tiempo tras la inyección. Como se muestra en la Figura 3A, la argirina A inhibió todas las actividades del proteasoma tras la aplicación i.p. La actividad inhibidora máxima se alcanzó a las 48 horas de la inyección y todas las actividades volvieron a los niveles basales a las 72 horas de la inyección. En base a este hallazgo, los inventores trataron ratones portadores de tumores con 0,15 mg de argirina por kilogramo de peso corporal inyectado por vía intraperitoneal cada tres días.

Como se muestra en la Figura 3B, la argirina A condujo a una reducción significativa del tamaño de los tumores xenotransplantados usados en estos experimentos. La extensión y la cinética de la regresión del tumor fueron comparables a lo observado en los animales tratados con bortezomib o incluso más pronunciados. No obstante, es importante el hecho de que los inventores no observaron ningún signo de molestia, pérdida de peso (Figura 3C) o enfermedad en los animales tratados con argirina A en comparación con los tratados con bortezomib.

Para analizar la extensión de la inhibición del proteasoma, la inducción de p27<sup>kip1</sup> y el desarrollo de muerte celular apoptótica en tejido tumoral primario, los inventores trataron a los ratones portadores de tumor con una única dosis de argirina A o bortezomib y explantaron los tumores a los puntos de tiempo indicados después. Como se muestra en la Figura 3D, los tratamientos tanto con bortezomib como con argirina A condujeron a una reducción significativa de la actividad del proteasoma en el tejido tumoral primario.

Es importante el hecho de que la argirina A producía una inducción de p27<sup>kip1</sup> y la muerte celular apoptótica en más del 60 % de todas las células tumorales (Figura 3E, F). Este resultado era inesperado, ya que las células SW480 eran altamente sensibles al tratamiento con argirina A *in vitro*. Por tanto, los inventores decidieron analizar si la argirina A también mostraría un efecto contra los xenoinjertos tumorales derivados de HCT116, ya que estas líneas celulares no sufrieron apoptosis *in vitro*, sino que, en su lugar, se detuvieron en la fase G1. El resultado de estos experimentos se muestra en la Figura 4A. Aunque la reducción del tamaño tumoral no era tan pronunciada como en los xenotransplantes derivados de SW480, los inventores todavía observaron una reducción significativa del volumen del tumor tras el tratamiento con argirina A. Es interesante que cuando los tumores derivados de SW480 o de HCT116 se explantaron mostraron uniformemente un gran área necrótica en el centro del tumor llena de sangre y tejido tumoral necrótico (Figura 4B). Este fenotipo a menudo se observa con fármacos que interfieren en la formación de vasos sanguíneos o compuestos que dañan directamente los vasos tumorales existentes. Por tanto, los inventores determinaron la densidad de los microvasos en tejidos tumorales (SW480 o HCT116) de ratones que recibieron una única inyección de argirina A. La figura 4X muestra que la argirina A conduce a una reducción significativa del número de células endoteliales positivas para CD31 que comienza ya a los 90 minutos de la inyección y sólo aproximadamente el 10 % de las células positivas para CD31 permanece a las 72 horas de la inyección (véase la figura 3A complementaria para una tinción representativa). Esta reducción de la vasculatura tumoral se realizó en paralelo a una inducción de la expresión de p27<sup>kip1</sup> en las células endoteliales positivas para CD31. (Figura 7A). Para entender este fenotipo con más detalle, los inventores analizaron el material tumoral primario mediante microscopía electrónica. Ya a los 90 minutos de la inyección los inventores observaron tumefacción de las células endoteliales seguida de una pérdida de la unión a la membrana basal y de los contactos célula-célula (Figura 4D) en la vasculatura tumoral. Como resultado de la pérdida aparente de unión celular y de la membrana basal tras el tratamiento con argirina A, muchos de los vasos sanguíneos tumorales examinados estaban obstruidos con células endoteliales o eritrocitos. Por tanto, la destrucción del núcleo del tumor que observaron los

inventores tras el tratamiento con argirina A podría ser un resultado de la oclusión trombótica de los vasos sanguíneos afectados. Por el contrario, la reducción inducida por bortezomib de las células positivas a CD31 se correlacionó con la aparición de células endoteliales necróticas (Figura 4D).

Después, los inventores preguntaron si la argirina A también podía prevenir la formación de estructuras de tubo de tipo capilar formadas por HUVEC en matrigel, un ensayo de uso frecuente para analizar la capacidad de un compuesto para interferir en la neovascularización. La Figura 4E muestra una cuantificación de la longitud relativa de los tubos capilares formados por HUVEC tras estimulación con VEGF. La adición de argirina A condujo a una reducción del 40 % en la formación de tubos en este ensayo. Es importante el hecho de que la transfección de ARNsi contra p27 protegía a las células endoteliales contra la actividad inhibidora de argirina A. Los efectos ejercidos por bortezomib en este ensayo fueron menores y no rescatados por la pérdida de p27. Además de la longitud del tubo, los inventores también cuantificaron el número de estructuras de tipo vaso sanguíneo formadas por HUVECS tras el tratamiento con argirina A o bortezomib (Figura 4F). Ambos tratamientos condujeron a una reducción significativa de las estructuras de tipo vaso. No obstante, la pérdida de p27 solo tuvo un efecto significativo sobre el fenotipo inducido por argirina A, lo que refuerza la conclusión de que la argirina A ejerce sus funciones biológicas a través de un incremento de la expresión de p27<sup>kip</sup>.

En este trabajo, los inventores identifican al péptido cíclico derivado de mixobacteria Argirina A como un compuesto que ejerce sus funciones biológicas bloqueando el recambio celular de p27<sup>kip</sup>. La estabilización de p27<sup>kip</sup> condujo a la detención en G1 o apoptosis en diferentes células tumorales humanas *in vitro*. Tratando los tumores xenotransplantados derivados de líneas celulares de cáncer de colon humano, los inventores muestran además que la argirina A también afecta a la vasculatura del tumor. Sus actividades antiangiogénicas abarcan la inhibición de la neovascularización *in vitro*, pero pronunciaron todavía más la destrucción de los vasos sanguíneos tumorales establecidos *in vivo*. Los inventores muestran que la destrucción del núcleo del tumor se acompaña de un desprendimiento de células endoteliales de la membrana basal y de una pérdida de contactos célula-célula. De un modo similar, las células HUVEC *in vitro* muestran una reducción de la formación de adherencias locales y de fibras de estrés tras el tratamiento con argirina A que se correlaciona con una menor actividad de RhoA. En el mismo contexto, la pérdida o supresión de la expresión de p27<sup>kip</sup> en células tumorales confirió resistencia a la actividad inductora de apoptosis de la argirina A. Juntas, estas observaciones avalan la conclusión de que las actividades antitumorales de la argirina A están mediadas por la estabilización de p27<sup>kip</sup>.

El mecanismo molecular por el cual la argirina A estabiliza el p27<sup>kip</sup> es a través de la inhibición del proteasoma 20S. Esta conclusión se basa en la observación de que la argirina A es capaz de inhibir todas las actividades proteasómicas del proteasoma 20S purificado *in vitro*, así como en las células de sangre periférica y en los tejidos tumorales *in vivo*. Bloqueando la actividad del proteasoma con ARNsi dirigido contra las subunidades críticas, los inventores encontraron sorprendentemente que p27<sup>kip</sup> es de hecho necesario para la función inductora de apoptosis de la inhibición del proteasoma *per se*. Por tanto, la pérdida o expresión reducida de p27<sup>kip</sup> podría tener como resultado un incremento de la resistencia de las células tumorales contra procesos que conducen a la acumulación de proteínas que normalmente son degradadas por el proteasoma. Los inventores sugieren que la estabilización de p27<sup>kip</sup> mediante argirina A y otras argirinas tal como se describe en el presente documento, tal como, en concreto, argirina F, representa una valiosa nueva estrategia para el tratamiento de neoplasias malignas humanas.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona a un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que el medicamento comprende además ingredientes antitumorales adicionales farmacéuticamente activos, tales como paclitaxel y/o bortezomib.

Otro aspecto de la presente invención también proporciona un procedimiento para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que necesite tal tratamiento una cantidad eficaz de la preparación farmacéutica de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, dicho cáncer se selecciona de cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de pulmón y cáncer de colon. Preferentemente, dicho paciente es un ser humano. Con tratar se quiere decir incluir, por ejemplo prevenir, tratar, reducir los síntomas de la enfermedad o afección o curar la enfermedad o afección.

La invención también se refiere a un procedimiento para tratar un sujeto en riesgo de una enfermedad como anteriormente, en el que se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto como se ha indicado anteriormente. Estar en riesgo de la enfermedad puede ser el resultado de, por ejemplo, un historial familiar de la enfermedad, un genotipo que predispone a la enfermedad o síntomas fenotípicos que predisponen a la enfermedad.

Las SEQ ID Nº 1 a 14 muestran las secuencias de las moléculas de ARNsi como se usan en la presente invención.

Leyendas de las figuras:

La Figura 1 muestra que la argirina A induce estabilización de p27 mediante la inhibición del proteasoma 20S. a) Las líneas celulares indicadas se trajeron con argirina A y las fracciones G1 y subG1 se determinaron mediante análisis de citometría de flujo de células teñidas con yoduro de propidio. Los valores de CI50 se determinaron mediante ensayos de proliferación celular MRR usando concentraciones diferentes de argirina A. El valor de CI50 se calculó

como la concentración semimáxima a la cual la argirina A ejercía un efecto. b) Las células SW480, HCT116 y HeLa se trataron con argirina A, tras lo cual las células se lisaron en los puntos de tiempo indicados para determinar los niveles de expresión de p27<sup>kip1</sup> mediante transferencia de tipo western. c) Las células SW480 and HeLa se trataron con argirina A o se dejaron sin tratar durante 12 horas, tras lo cual se añadió cicloheximida a una concentración de 25 µg/ml. Los niveles de expresión de p27<sup>kip1</sup> se determinaron a los puntos de tiempo indicados mediante transferencia de tipo western y se normalizaron contra la expresión de actina, que se usó como control interno. Los gráficos muestran una cuantificación de tres experimentos independientes. d) El proteasoma 20S derivado de eritrocitos humanos purificados se incubó con las cantidades indicadas de argirina A o bortezomib y la actividad del proteasoma de tipo caspasa, quimotripsina y tripsina se midió usando sustratos peptídicos fluorogénicos específicos de las diferentes actividades catalíticas. e) Las líneas celulares SW480 and HCT116 se incubaron con argirina A. A los puntos de tiempo indicados se lisaron las células y los niveles de expresión de p53, p21, Bax, NfkB y actina se analizaron mediante transferencia de tipo western.

La Figura 2 muestra que la apoptosis inducida por inhibición del proteasoma depende de la expresión de p27<sup>kip1</sup> a) Para determinar si la inducción de muerte celular apoptótica por argirina A depende de la expresión de p27<sup>kip1</sup>, los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) derivados de ratones silvestres (WT) o defectivos en p27 (KO) se trataron con argirina A. El número de células apoptóticas se determinó midiendo la fracción sub-G1 mediante citometría de flujo usando células teñidas con yoduro de propidio. Los resultados mostrados son los números medios de seis experimentos independientes. b+d) MEF silvestres (b) y defectivos en p27 (d) MEF se trataron con argirina A o se transfeccionaron con ARNsi específico de la subunidad β1, β2 o β5 del proteasoma durante 24 horas. Los gráficos muestran la actividad catalítica restante de las diferentes subunidades del proteasoma tras el tratamiento con argirina A o ARNsi en comparación con un control sin tratar (n= 3). Las transferencias de tipo western muestran la expresión de la subunidad β1, β2 o β5 del proteasoma en células en proliferación y tras el tratamiento con ARNsi para un experimento representativo. c+e) Mediciones de citometría de flujo del número de células apoptóticas (fracción sub-G1) tras el tratamiento con argirina A o ARNsi en MEF silvestres (c) o defectivos en p27 (E). f) Las células HeLa se trataron con argirina A o ARNsi contra p27 o argirina A y ARNsi contra p27 durante 24 o 48 horas. Las transferencias de tipo western muestran los niveles de expresión para p27 en respuesta a los diferentes tratamientos. g) el mapa térmico muestra un análisis de correlación de los perfiles de expresión génica de todo el genoma de células de cáncer de mama MCF7 que se trataron con argirina A o bortezomib para los tiempos indicados. La correspondiente matriz de valores de correlación se da en la figura 6d.

La Figura 3 muestra que la argirina A induce apoptosis en xenoinjertos de cáncer de colon humano *in vivo* a) Los ratones recibieron inyección i.p. con argirina A (0,03 mg/kg de peso corporal) o bortezomib (1mg/kg de peso corporal). A los puntos de tiempo indicados se aisló el proteasoma 20S de células de sangre periférica y la actividad de las diferentes subunidades del proteasoma se determinó como se ha descrito (Figura 1d). b) Las líneas celulares de carcinoma de colon SW480 mezcladas con matrigel se inyectaron bajo la piel de ratones nu/nu para establecer tumores xenotransplantados. El tratamiento con argirina A o bortezomib se inició cuando estos tumores alcanzaron un volumen de 200 mm<sup>3</sup>. El gráfico muestra una cuantificación de volúmenes tumorales a los puntos de tiempo indicados en comparación con el tamaño de partida, que se estableció en 100 (n= 8 Argirina A (0,15 mg/kg de peso corporal), n= 4 Bortezomib (0,6 mg/kg de peso corporal), n= 10 PBS/EtOH control c). Todos los ratones fueron pesados a lo largo del experimento. El gráfico muestra los cambios en el peso corporal para los ratones tratados con argirina A o bortezomib. d) Determinación de la actividad del proteasoma en tejido tumoral tras el tratamiento con bortezomib y argirina A. tras una inyección de una vez de los respectivos compuestos, los tumores se explantaron a los puntos de tiempo indicados y se extrajeron los proteasomas del tejido tumoral. La actividad de las respectivas subunidades del proteasoma se determinó como se ha descrito anteriormente (Figura 1d). e) Determinación del número de células positivas para p27<sup>kip1</sup> en tejido tumoral tras el tratamiento con argirina A, Las imágenes muestran muestras representativas de tinciones inmunohistoquímicas para p27 en tejidos tumorales tras 10 de tratamiento con argirina A. f) Detección de células apoptóticas en tumores xenotransplantados mediante tinción TUNEL de los tejidos tumorales tras el tratamiento con argirina A o bortezomib. Se contaron al menos 200 células en cinco secciones independientes para cuantificar el número de células apoptóticas.

La Figura 4 muestra que la argirina A daña los vasos sanguíneos tumorales existentes e interfiere con la neovascularización de un modo dependiente de p27<sup>kip1</sup>, a) Líneas celulares de carcinoma de colon HCT116 mezcladas con matrigel se inyectaron bajo la piel de ratones nu/nu para establecer tumores xenotransplantados. El tratamiento con argirina A o bortezomib se inició cuando estos tumores alcanzaron un volumen de 200 mm<sup>3</sup>. El gráfico muestra la cuantificación de los volúmenes tumorales a los puntos de tiempo indicados en comparación con el tamaño inicial que se estableció en 100. (n= 8 argirina A, n= 8 Bortezomib, n=6 PBS/EtOH) b) Las imágenes muestran el aspecto macroscópico de un tumor xenotransplantado tras 10 días de tratamiento con argirina A. Obsérvese el gran centro necrótico del tumor explantado. c) Tras una única inyección de argirina A (0,15 mg/kg de peso corporal) o bortezomib (1,0 mg/kg de peso corporal) se explantaron los tumores a los puntos de tiempo indicados y los vasos sanguíneos en el tejido tumoral se tiñeron conjuntamente para CD31 y p27. (Véase también la Figura 7A para tinciones inmunofluorescentes representativos). El gráfico muestra una cuantificación de los datos. d) La ultraestructura de los microvasos se analizó tras la inyección de argirina A (fotografías de la derecha y del centro) o Bortezomib (fotografía de la izquierda), respectivamente. Obsérvese la tumefacción de la célula endotelial ("E") y la oclusión de la luz ("L") por eritrocitos tras 90 minutos de tratamiento con argirina A. La flecha marca el desprendimiento de células endoteliales tras 48 horas de tratamiento con argirina A. El panel de la izquierda muestra

células endoteliales apoptóticas tras el tratamiento con Bortezomib e+f) se cultivaron células HUVEC en medio nasal para células endoteliales suplementado con factores de crecimiento y que contiene 2 % de FCS durante 24 horas y se trataron con argirina A (1  $\mu$ M), bortezomib (10 nM), ARNSi contra p27, argirina A y ARNSi o bortezomib y ARNSi. La longitud del tubo (f) y 23 estructuras de tipo vaso sanguíneo se determinaron usando fotografías de cultivos HUVEC. Las micrografías muestran ejemplos representativos de cultivos HUVEC en las condiciones indicadas.

La Figura 5 muestra a) la estructura química de argirina A b) El gráfico muestra una cuantificación del porcentaje de células SW 480 apoptóticas determinado mediante un ELISA de fragmentos de ADN asociados a histonas tras el tratamiento con argirina A. Las células U937 tratadas con camptotecina se usaron como control positivo.

Figura 6a) Los gráficos muestran ejemplos representativos de mediciones por citometría de flujo de células silvestres y defectivas en p27 tras el tratamiento con argirina A o Bortezomib. b) MEF silvestres o defectivos en p27 se incubaron con argirina A y los niveles de expresión de p21, p53, Bax y actina se determinaron a los puntos de tiempo indicados. C) Las células de cáncer de mama MCF7 se incubaron con argirina A o Bortezomib durante 24 horas o se dejaron sin tratar y la actividad de las actividades de proteasoma de tipo caspasa, quimotripsina y tripsina se midieron usando sustratos peptídicos fluorogénicos específicos para las diferentes actividades catalíticas. d) Valores de correlación para la Figura 2G.

La Figura 7 muestra co-tinciones de inmunofluorescencia representativas de células endoteliales en tumores xenotransplantados de cáncer de colon humano para CD31 y p27.

La Figura 8 muestra que el tratamiento con argirina A es muy bien tolerado, como muestra el peso corporal de los ratones.

## 20 Materiales y procedimientos:

### Detección selectiva de alto rendimiento (HTS) para sustancias estabilizantes de p27

Se estableció una detección selectiva de alto rendimiento celular para compuestos estabilizantes de p27 se estableció introduciendo de forma estable un plásmido de ADN (EGFP-N1, Clontech) que permite la expresión de la proteína de fusión p27<sup>Kip1</sup>-GFP en células HeLa. Las células HeLa p27-GFP se sembraron en placas de 384 pocillos (Corning) y se incubaron con un conjunto de productos naturales muy diversos (parte de la colección de metabolitos mixobacterianos del Helmholtz Center for Infection Research) a una concentración de 70 nM. La emisión de GFP se determinó mediante mediciones fluorométricas usando un contador multimarcador Victor 1420 (Perkin Elmer) a 3 h, 24 h, 48 h y 60 h tras el inicio del tratamiento. El inhibidor del proteasoma MG132 se usó como control positivo.

### Células y cultivo tisular

30 Fibroblastos humanos primarios HKI; HCT116 (cáncer de colon), MCF7 (cáncer de mama), CaCo (cáncer de colon), A549 (cáncer de pulmón), HeLa (cáncer cervical) y MEF inmortalizados se cultivaron en DMEM suplementado con 5 % de FCS y 2 mg/ml de penicilina/estreptomicina. Las células SW480 (cáncer de colon) se cultivaron en medio de MC Coy suplementado con 5 % de FCS y 2 mg/ml de penicilina/estreptomicina.

### Anticuerpos, Transferencia de tipo Western, Inmunofluorescencia, Inmunohistoquímica

35 Los experimentos de tinción inmunohistoquímica de tejido tumoral de ratón, transferencia de tipo western y de inmunofluorescencia se realizaron como se ha descrito en lo que antecede (Timmerbeul, I. y col., Testing the importance of p27 degradation by the SCFskp2 pathway in murine models of lung and colon cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 14009-14 (2006). Kossatz, U. y col., C-terminal phosphorylation controls the stability and function of p27Kip1. Embo J 25, 5159-70 (2006).). Se usaron los anticuerpos siguientes: p27 (Nº cat. K25020-150 ; Transduction Labs), p21 (N20; Santa Cruz), p53 (FL-393; Santa Cruz), NfKB (C-20; Santa Cruz), Bax (P-19; Santa Cruz), Alexa fluor 488 (# A11001; Invitrogen), subunidad beta 2 del proteasoma 20S (Z) (PW9300; Biomol, para células humanas), 20S-subunidad beta 2 del proteasoma 20S (Z) (PW8145; BIO TREND, para células de ratón); subunidad beta 1 del proteasoma 20S (Y) (PW8140; BIO TREND), subunidad beta 5 del proteasoma 20S (PW8895; BIO TREND) ; PECAM Clon de anticuerpos MEC 13.3 (# 550274; BD Pharmingen).

### 45 Ensayos MTT, Apoptosis, Citometría de flujo

Los ensayos MTT se realizaron como se ha descrito en lo que antecede (Sasse, F. y col., Argyrins, immunosuppressive cyclic peptides from myxobacteria. I. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. J Antibiot (Tokyo) 55, 543-51 (2002)). La tinción TUNEL de secciones tisulares se realizó con secciones de 10 micrómetros que se desparafinizaron y se trataron según las recomendaciones del fabricante. (Kit de detección de muerte celular in situ, Fluoresceína; ROCHE, Nº de Cat. 11 684 795 910). Se realizó análisis citométrico de flujo de células cultivadas usando un citómetro de flujo de fluorescencia de Becton Dickinson como se ha descrito en lo que antecede (Malek, N.P. y col., A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. Nature 413, 323-7 (2001)). El análisis de la distribución de las células en el ciclo celular y la fracción sub-G1 se realizó usando el software Cell Quest. Se usó un ELISA de fragmentos de ADN asociados a histonas para determinar el número de células apoptóticas de acuerdo con las instrucciones de los

fabricantes (Roche # 11 774425001).

#### **ARNsi**

Se realizó detención del ARNSi usando reactivo de transfección FuGene6 ® o el reactivo de transfección HiPerFect. Las transfecciones se realizaron usando ARNSi en una concentración de 0,2 nM para Psmb1, Psmb2, PSMB1, PSMB2 y CDKN1B y en una concentración de 0,4 nM para Psmb5 y PSMB5. Todos los ARNSi se adquirieron en Ambion.

#### **p27 ID118714**

p27 directo: 5'-CGUAAACAGCUCGAAUUAAtt-3' (SEC ID Nº 1)

inverso: 5'-UUAAUUCGAGCUGUUUACGtt-3' (SEC ID Nº 2)

#### **Psmb1:ID:68878:**

Psmb1 directo: 5'-GGAUUUCAAUUCAUACCCtt-3' (SEC ID Nº 3)

inverso: 5'-GGGU AUGAAUUGAAAAUCCtt-3' (SEC ID Nº 4)

#### **Psmb2:ID70480:**

Psmb2 directo: 5'-GGACGAUCAUGACAAGAUGtt-3' (SEC ID Nº 5)

#### **15 Psmb5:ID 68783**

Psmb5 directo: 5'-GGUGCUUAAUUGCUUCCtt-3 (SEC ID Nº 7)

inverso: 5'-GGGAAGCAAUAAGCACCCtg-3' (SEC ID Nº 8)

#### **PSMB1:ID105612**

#### **20 PSMB1 directo: 5'-GACUGUCUUACGCUGACAAAtt -3' (SEC ID Nº 9)**

inverso: 5'-UUGUCAGCGUAAGACAGUCtc -3' (SEC ID Nº 10)

#### **PSMB2:ID:105614**

PSMB2 directo: 5'-GAUAAAUCUCCUGUGUUtt -3' (SEC ID Nº 11)

inverso: 5'-AACACACAGGAGUAAUACtt -3' (SEC ID Nº 12)

#### **25 PSMB5:ID:105622**

PSMB5 directo: 5'-GAAGAGCCAGGAAUCGAAAtt -3' (SEC ID Nº 13)

inverso: 5'-UUUCGAUUCUCCUGGCCUUCtg -3' (SEC ID Nº 14)

#### **Purificación del proteasoma, ensayos de proteasoma**

Los ensayos proteasómicos con el proteasoma 20S purificado se realizaron como se ha descrito en lo que antecede (Lightcap, E.S. y col., Proteasome inhibition measurements: clinical application. Clin Chem 46, 673-83 (2000)) usando proteasoma 20S derivado de eritrocitos (Biomol International, LP PW8720) y sustratos fluorométricos Succ-LLVY-AMC, BZ-VGR-AMC y Z-Lle-AMC (Biomol International, LP PW9905) como sondas de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La extracción del proteasoma de las células y secciones tumorales se realizó como se ha descrito en lo que antecede (Crawford, y col., Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLLCOCHO, PS-341, and MG-132. Cancer Res 66, 6379-86 (2006)). Brevemente, el homogeneizado de muestras celulares MEF o MCF-7) o tisulares (secciones tumorales) se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis ATP/DTT (10 mmol/l Tris-HCl (pH7,8), ATP 5 mmol/l, DTT 0,5 mmol/l, MgCl<sub>2</sub> 5 mmol/l) y se incubaron en hielo durante 10 minutos, seguido de ultrasonidos durante 15 segundos. Los lisados se centrifugaron a 400 x g durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante resultante que contiene proteasomas era estable a -80 °C con la adición de 20 % de glicerol durante al menos 1 mes. La concentración de proteínas de las muestras se midió usando un ensayo de proteínas con Coomassie (Pierce, Rockford, IL).

Para la extracción de proteasoma de sangre entera, pellas de células de sangre entera congeladas se descongelaron y lisaron en 2-3 volúmenes de las pellas de tampón de lisis frío (EDTA 5 mM, pH 8,0). Los lisados se centrifugaron a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo fresco. Se extrajeron 5 µl para la determinación de la concentración de proteínas usando un ensayo de proteínas con Coomassie (Pierce, Rockford, IL).

Los ensayos del proteasoma usando proteasoma purificado de células o tejidos se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 100  $\mu$ l que contenía 20  $\mu$ g de extracto de proteasoma, EDTA 50 mmol/l y 60  $\mu$ mol/l de sustrato fluorogénico (de tipo quimotripsina (CT-L), de tipo tripsina (T-L) o de tipo caspasa (C-L) en tampón de lisis ATP/DTT a 37 °C. El tampón de ensayo se suplementó con una concentración final de 0,05 % de SDS para la evaluación de la actividad de tipo quimotripsina y la actividad de tipo caspasa. La velocidad de escisión de los sustratos peptídicos fluorogénicos se determinó monitorizando la fluorescencia de la aminometilcumarina liberada usando un contador Victor 1420 Multilabel (Wallac) a una longitud de onda de excitación de 395 nm y a una longitud de onda de emisión de 460 nm durante un periodo de 60 minutos.

#### **Cultivo de HMVEC, ensayo de formación de estructura de tubo de tipo capilar in vitro e inmunofluorescencia**

10 Las células endoteliales microvasculares primarias (HMVEC) se aislaron de prepucio humano. Las células se mantuvieron a 37 °C y 10 % de CO<sub>2</sub> en EGM-2 MV de Cambrex, que incluye el medio basal (EBM-2), FBS, hidrocortisona, hFGF-B, VEGF, R3-IGF, ácido ascórbico, hEGF, gentamicina y anfotericina. El efecto de la argirina A o el bortezomib sobre la angiogénesis *in vitro* se determinó mediante el ensayo de formación de estructura de tubo de tipo capilar en matriz. Para investigar el efecto de los diferentes compuestos sobre la angiogénesis *in vitro* se sembraron HMVEC en placas de cultivo de 96 pocillos revestidas previamente con Matrigel (BD Biosciences, #354248) y expuestas a argirina A o bortezomib. Las redes dentro de las estructuras de tubo de tres campos elegidos aleatoriamente se puntuaron bajo el microscopio (Leica, Cambridge, Reino Unido). Las imágenes se tomaron con una cámara Axio Vision 3.1 Zeiss y se puntuaron determinando la longitud del tubo y la formación de estructuras de tipo vaso cerrado.

#### **20 Estudios con xenotransplantes**

1x107 células SW480 o células HCT116 (en 100 microlitros de medio DMEM y 100 microlitros de matriz) se inyectaron s.c. en los flancos de ratones NMRI nu/un. Los tumores crecieron durante aproximadamente 18 días hasta que alcanzaron el tamaño adecuado (200 mm<sup>3</sup>). El tamaño del tumor se midió con un compás digital y se calculó con la ayuda de la fórmula siguiente : (longitud x anchura 2)<sup>2</sup> \*  $\pi/6$ . Todos los experimentos se realizaron tras revisión y de acuerdo con las agencias de protección y derechos de los animales de Lower Saxony, Alemania.

#### **EM**

Muestras pequeñas del tumor se fijaron en 2,5 % de glutaraldehído (Polysciences, Warrington, PA, EE.UU.) en cacodilato sódico 0,1M, pH 7,3 y después se fijaron con 2 % de tetraóxido de osmio (Polysciences) en el mismo tampón. Tras la deshidratación en alcoholos graduados se incluyeron en Epon (Serva, Heidelberg, Alemania). Secciones finas se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo se examinaron en un microscopio electrónico Philips EM 301. Las micrografías electrónicas se seleccionaron, digitalizaron y procesaron usando Adobe Photoshop 6.0.

#### **Hibridación y Análisis de micromatriz de ADN**

La calidad y la integridad del ARN total aislado se controló pasando todas las muestras en un bioanalizador Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies; Waldbronn, Alemania). Para la síntesis de la diana marcada con biotina comenzando con 3  $\mu$ g de ARN total, las reacciones se realizaron usando protocolos estándar suministrados por el fabricante (Affymetrix; Santa Clara, CA). En cada caso se hibridaron 10  $\mu$ g de ARNc marcado a un lote idéntico de Affymetrix GeneChips HG-U133 2.0 durante 16 horas a 45 °C. Tras la hibridación se lavaron los GeneChips, se tiñeron con SA-PE y se leyeron usando una estación fluida Affymetrix GeneChip y un escáner.

#### **40 Análisis de Datos**

El análisis de datos de la micromatriz se realizó usando el software Affymetrix GCOS 1.2. Para la normalización, todos los experimentos con la matriz se escalaron hasta una intensidad diana de 150, si no, se usaron los valores por defecto de GCOS 1.2. El conjunto de todos los datos se depositó en el servidor de la base de datos pública GEO en un formato de acuerdo con MIAME y está disponible con el número de acceso GSE8565. El coeficiente de correlación para un par de matrices se definió como

$$\sum_i [(a_i - \mu_a) * (b_i - \mu_b)] / n(\sigma_a * \sigma_b)$$

En la que  $a_i$  son las señales en la matriz  $a$ ,  $b_i$  son las señales en la matriz  $\beta$ ,  $\mu$  y  $\sigma$  son las respectivas medias y desviaciones típicas y  $n$  es el número de artículos en cada matriz. El agrupamiento funcional en base a los términos de ontología génica se realizó usando Array Assist 5.1 (Stratagene, La Jolla, CA).

#### **50 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó usando el software Microsoft Excel. Si no se indica lo contrario, todos los datos se presentan como la media +/- SD (las barras de error representan la SD en todas las figuras). Las comparaciones

entre grupos se realizaron mediante una t de student de dos colas. Los valores de probabilidad de  $p < 0,05$  se interpretaron para indicar significación estadística.

#### **Generación de la línea celular p27-GFP como constructor indicador**

El ADN de p27 humano (en el vector plasmídico CS2+) se digirió con EcoR1 y BamHI, y el fragmento resultante se ligó tras purificación en gel en el vector pEGFP-N1 (Clontech), que se cortó con las mismas enzimas de restricción. Por tanto se generó una fusión de desplazamiento del marco de lectura con el GFP como está contenido en el vector pEGFP. Después, el plásmido se transfeccionó a células HeLa y, tras la selección de las células con kanamicina, se aislaron los clones celulares que tenían el plásmido integrado de forma estable en su cromosoma. La expresión de las proteínas p27EGFP se confirmó usando transferencias Western y precipitaciones inmunes para p27 y para GFP.

#### **10 Efecto de diferentes derivados de argirina**

En la tabla siguiente se resumen los efectos de los derivados de argirina A a H sobre dos líneas celulares de cáncer, H15 (carcinoma de cuello uterino) y SW-480 (cáncer de colon). Con el fin de analizar la eficacia se usó un clon p27-GFP.

#### **Efecto de diferentes derivados de argirina**

	Media de FSC-H (Log)*	CMI (visual)** [μg/ml]	CMI (visual)** [μg/ml]	CI-50 *** [μg/ml]
	H15 P27-GFP-clon	H15	SW-480	SW-480
Argirina				
A	8,52	4	4	Aprox. 0,05
B	7,60	12	12	Aprox. 0,05
C	7,36	37	37	Aprox. 0,05
D	7,69	12	37	Aprox. 0,05
E	8,52	4	4	0,7
F	11,24	0,5	0,2	0,05
H		37	37	Aprox. 0,05

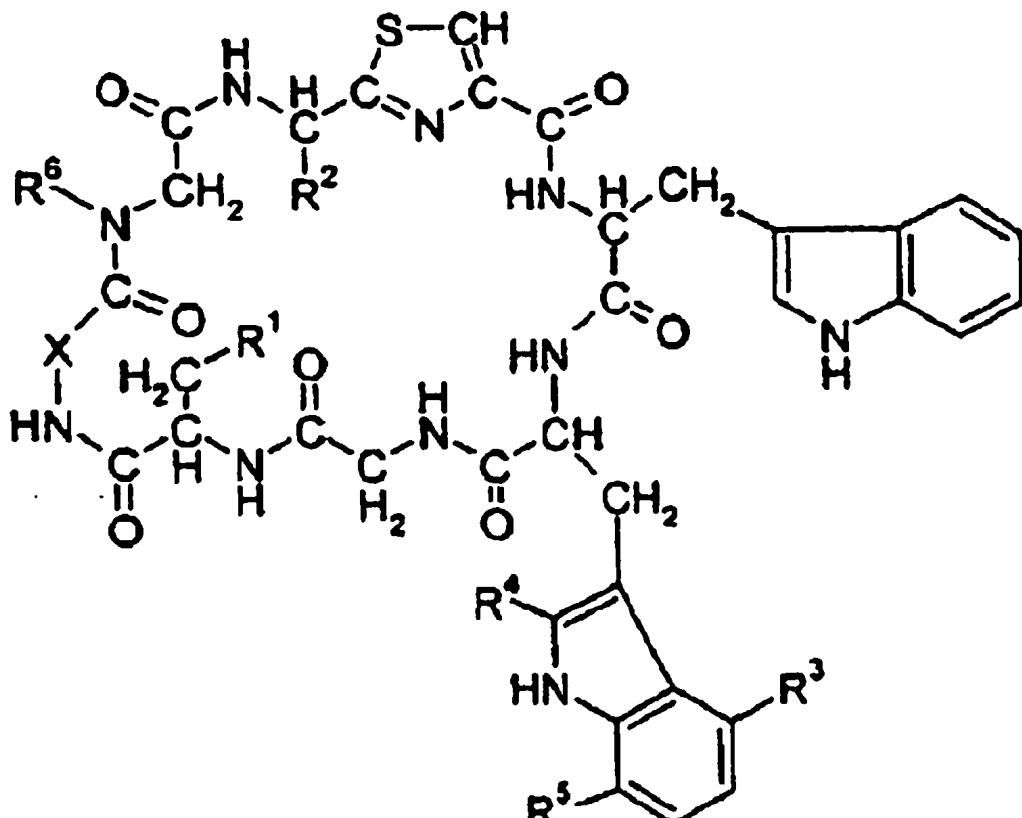
\*La fluorescencia de GFP se determinó mediante FACS tras una incubación de 24 horas del clon H15GFP-p27 (línea celular; carcinoma de cuello uterino) con los diferentes derivados de argirina (500 ng/ml).

\*\*Concentración mínima de una dilución en serie que exhibe un efecto visual.

\*\*\*Inhibición semimáxima de la proliferación de SW-480 (línea celular de cáncer de colon; análisis tras una prueba MTT). Dado que todos los derivados con la excepción de E y F muestran una progresión bifásica de la inhibición, con una meseta al 50 % de inhibición, la determinación de un valor de CI50 es difícil. Se puede ver que la argirina F es particularmente eficaz y, por tanto, preferida.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula I:



- 5 en la que  
 $R^1$  y  $R^2$  son, de forma independiente, hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con OH o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;  
 $R^3$  es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> que está insustituido o sustituido con OH u OR, en el que R está seleccionado de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, arilo o acetilo,  
10  $R^4$  es hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con OH o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;  
 $R^5$  es hidrógeno o halógeno;  
 $R^6$  es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; y  
X es C=CH<sub>2</sub> o CHR<sup>7</sup> en el que R<sup>7</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con -S-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y sus sales farmacéuticamente aceptables, para la producción de un medicamento para el tratamiento de cáncer en un sujeto.
- 15 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que  
 $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  son, de forma independiente, hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> que está insustituido o sustituido con OH o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;  
 $R^4$  es hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con OH o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;  
 $R^5$  es hidrógeno o halógeno;  
20  $R^6$  es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; y  
X es C=CH<sub>2</sub> o CHR<sup>7</sup> en el que R<sup>7</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con -S-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y sus sales farmacéuticamente aceptables.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que  
 $R^1$  es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> insustituido, por ejemplo metilo;  
25  $R^2$  es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que está insustituido o sustituido con OH, por ejemplo metilo o hidroximetilo;  
 $R^3$  es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, por ejemplo metoxi;  
 $R^4$  representa hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> insustituido, por ejemplo metilo;  
 $R^5$  es hidrógeno o bromo;  
30  $R^6$  es hidrógeno o metilo; y  
X es C=CH<sub>2</sub> o CHR<sup>7</sup> en el que R<sup>7</sup> es metilo que está insustituido o sustituido con -S-etilo y sus sales farmacéuticamente aceptables.

4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que

R<sup>1</sup> es hidrógeno o metilo;

R<sup>2</sup> es metilo o hidroximetilo;

R<sup>3</sup> es hidrógeno o metoxi;

5 R<sup>4</sup> es hidrógeno o metilo;

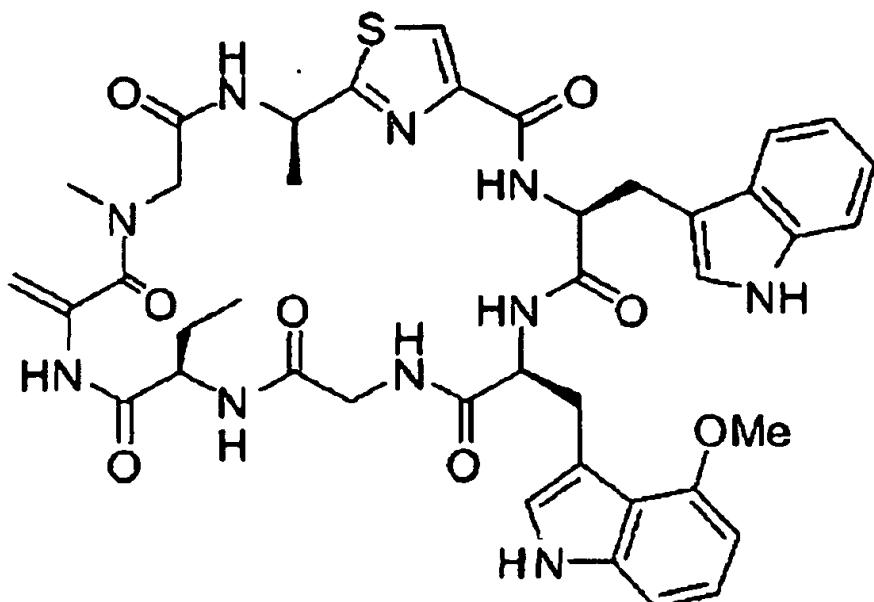
R<sup>5</sup> es hidrógeno;

R<sup>6</sup> es metilo; y

X es C=CH<sub>2</sub>,

Y sus sales farmacéuticamente aceptables.

10 5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto tiene la fórmula siguiente



Y sus sales farmacéuticamente aceptables

6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho compuesto es argirina F y sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

15 7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sujeto es un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano.

8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el tratamiento del cáncer comprende bloquear el crecimiento de las células tumorales y/o destruir la vasculatura tumoral existente, el tratamiento del cáncer de mama, el tratamiento del carcinoma hepatocelular, el tratamiento del carcinoma cervical, el tratamiento del carcinoma pulmonar, el tratamiento del mieloma múltiple y/o el tratamiento del cáncer de colon.

20 9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el medicamento comprende además ingredientes antitumorales adicionales farmacéuticamente activos, tales como paclitaxel.

10. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el compuesto se administra a una dosis de 0,01 mg a 200 mg/kg, preferentemente a una dosis de 0,01 mg a 100 mg/kg, más preferentemente a una dosis de 0,02 mg a 10 mg/kg.

Figura 1

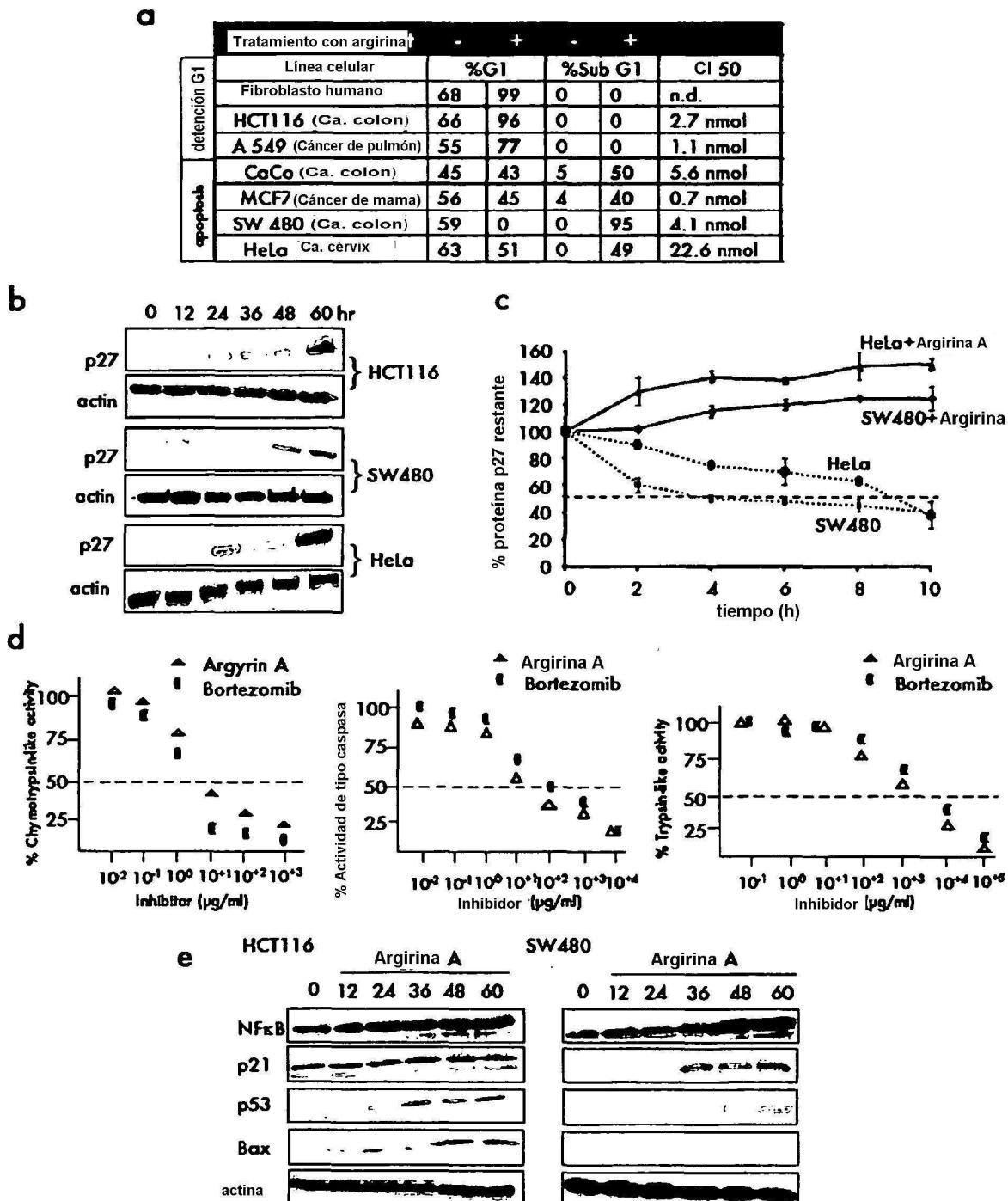
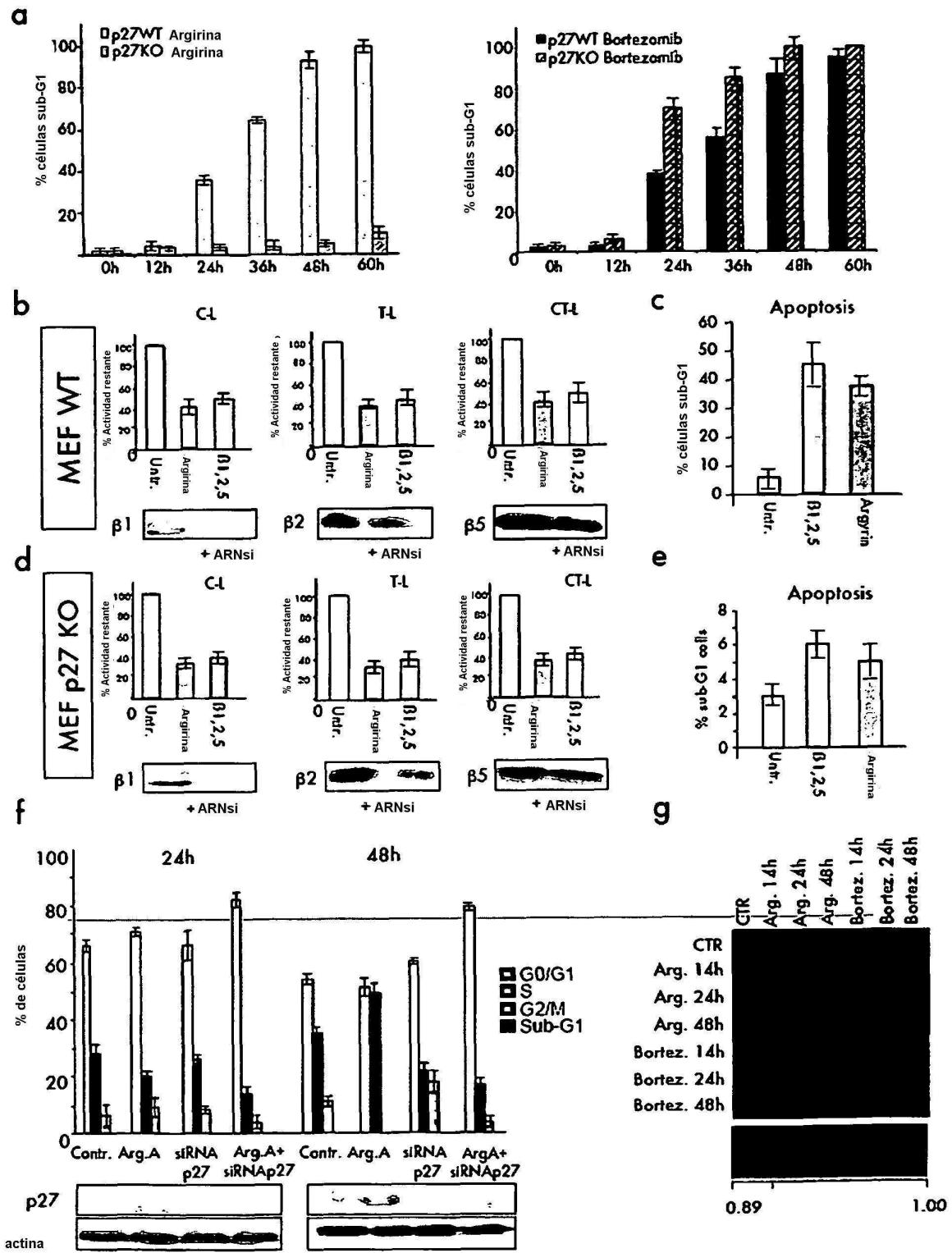
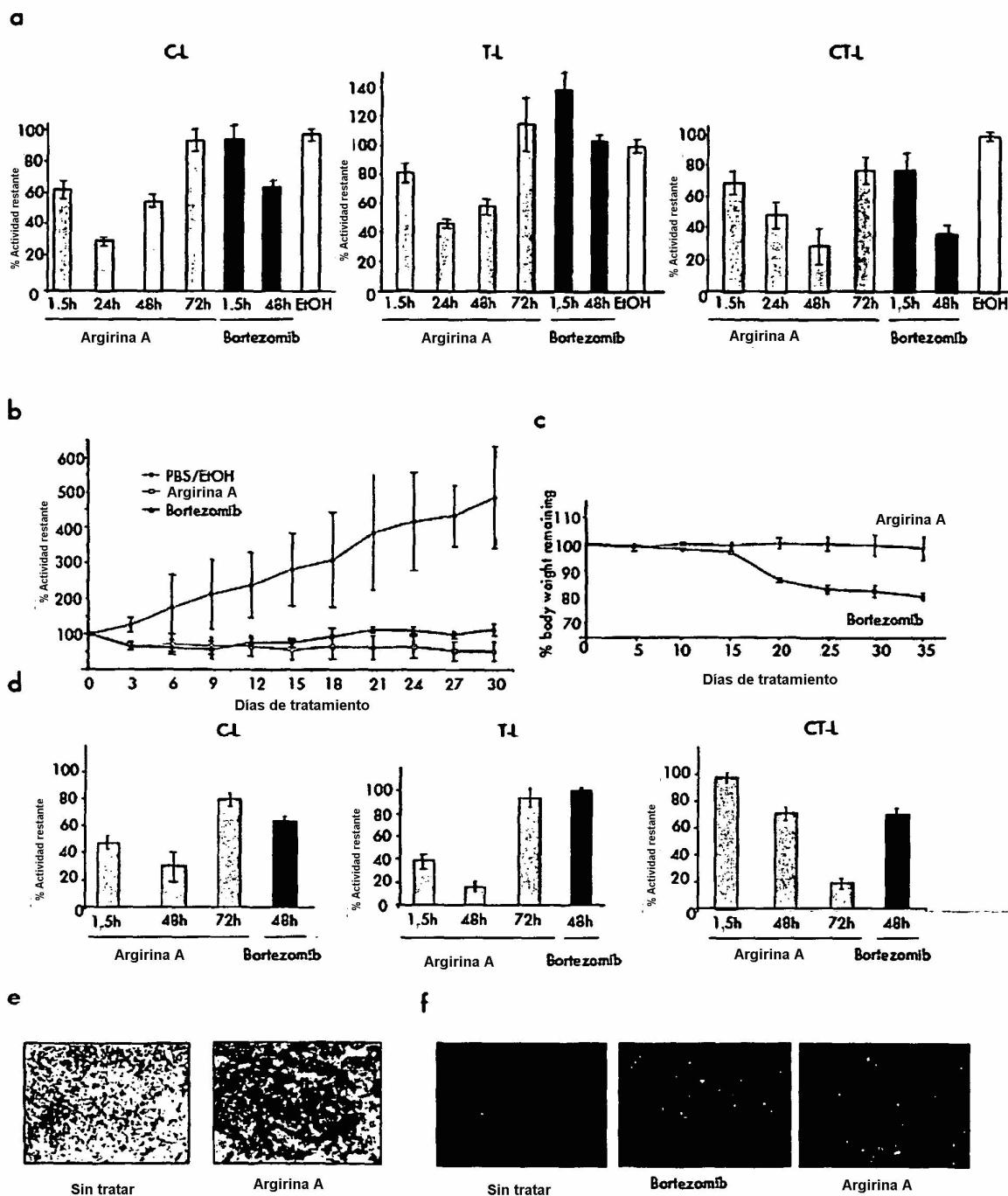


Figura 2



**Figura 3**

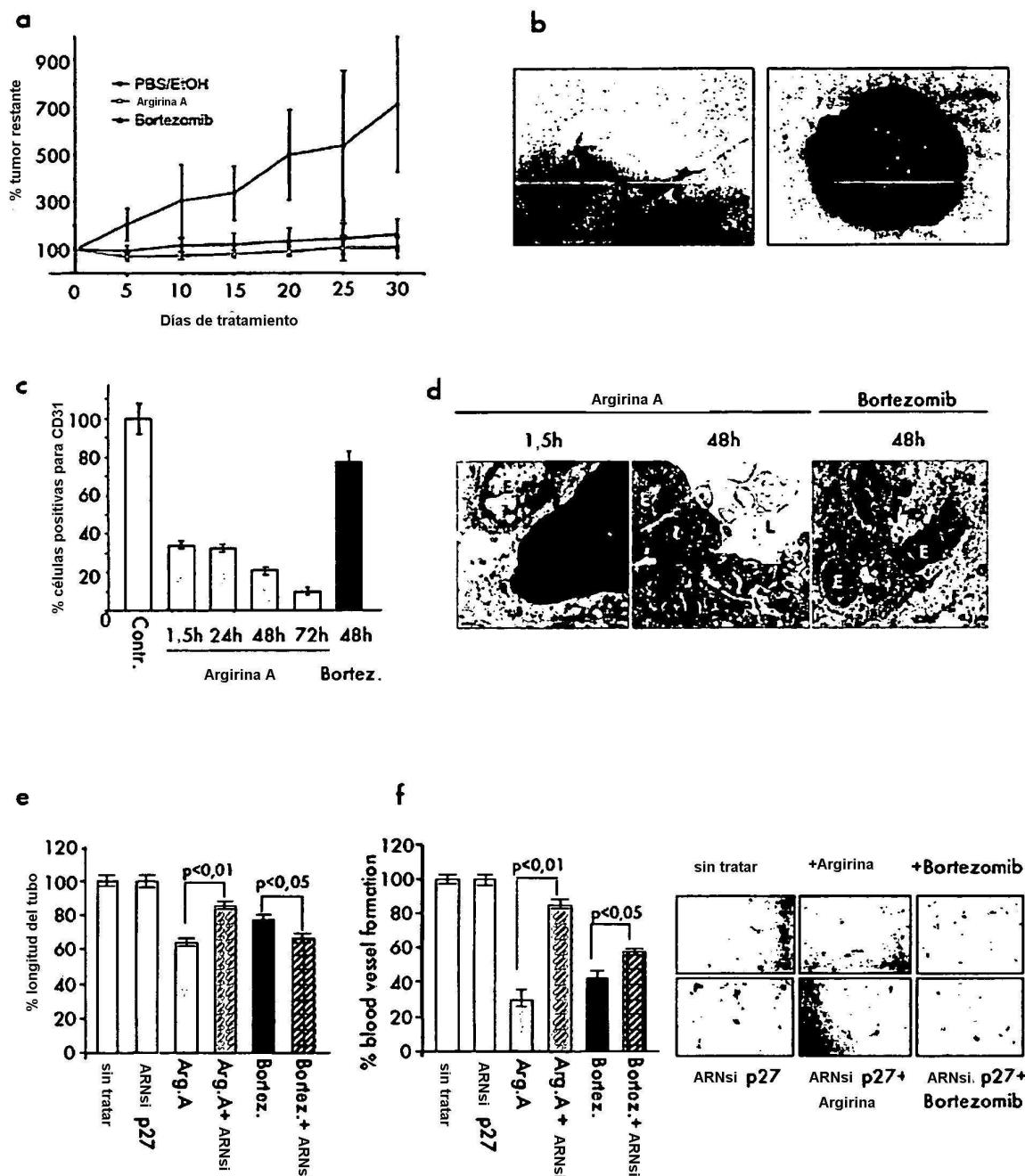
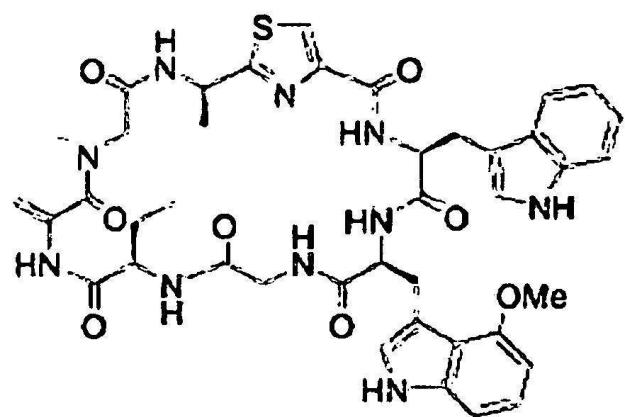
**Figura 4**

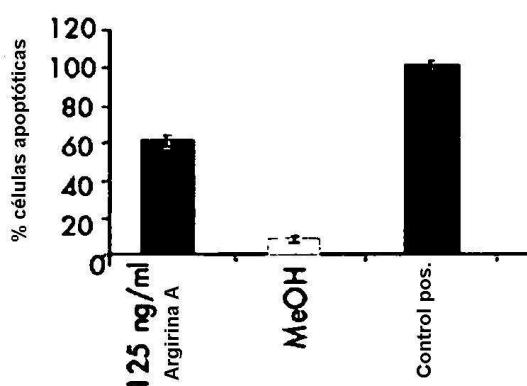
Figura 5

a



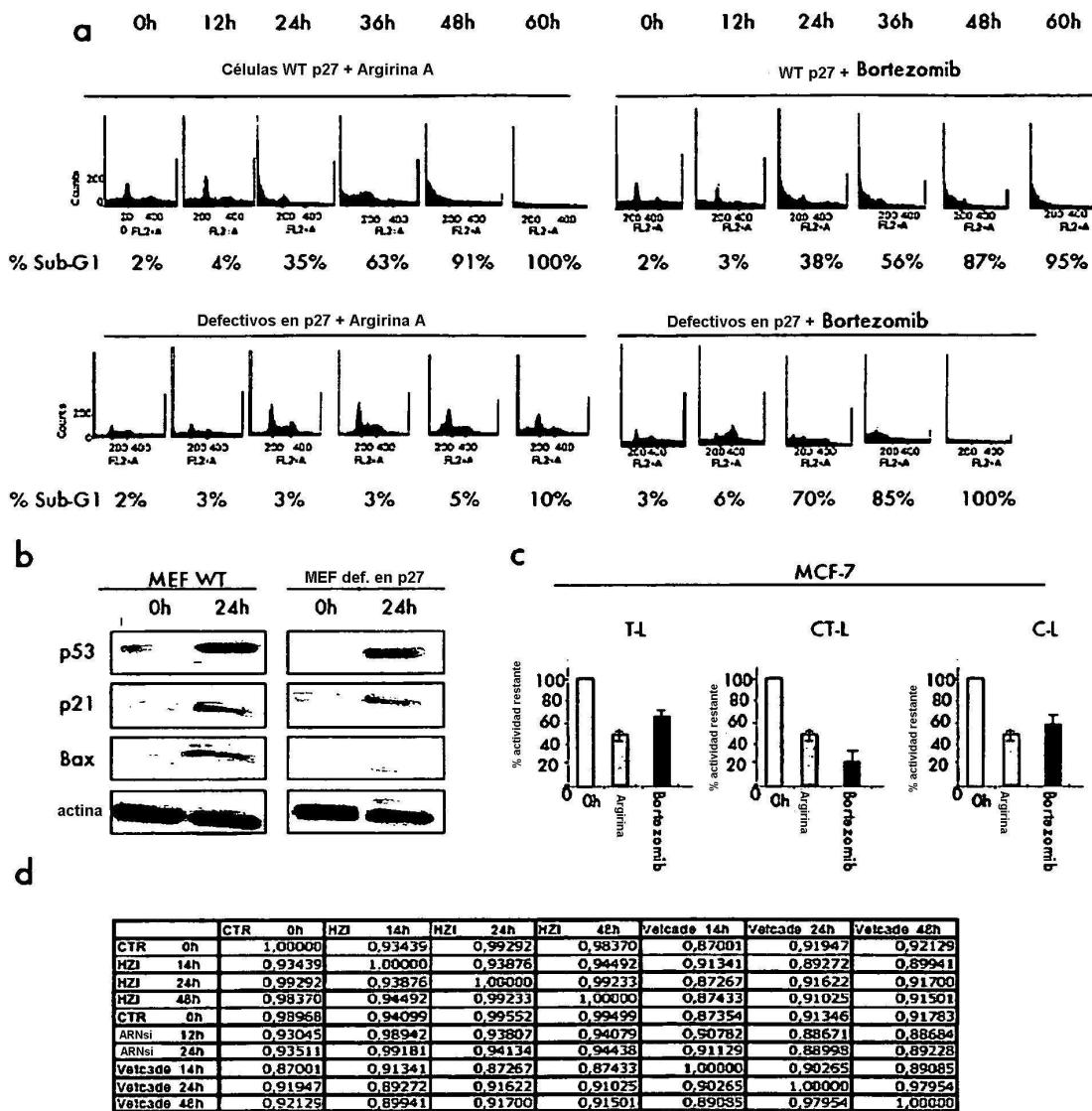
C<sub>41</sub>H<sub>66</sub>N<sub>10</sub>O<sub>3</sub>S  
Peso Mol.: 838,93

b



# ES 2 396 115 T3

**Figura 6**



**Figura 7**

**a**

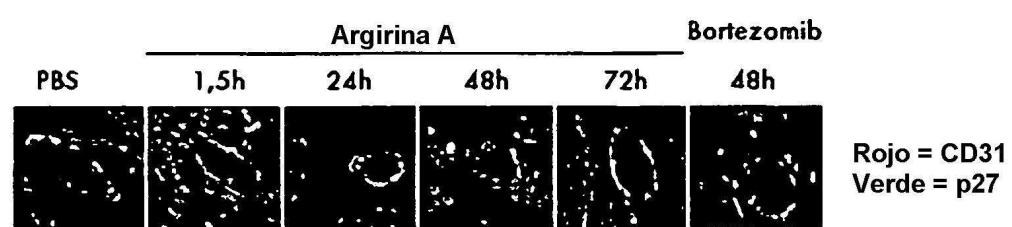


Figura 8

