

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 671**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/444** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2009 E 09783788 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 2349268**

54 Título: **N,N'-dióxidos de 3,3',4,4'-tetrahydroxi-2,2'-bipiridina para el tratamiento de carcinoma de células renales**

30 Prioridad:

**06.10.2008 US 195312 P**

**29.09.2009 US 586849**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**23.04.2013**

73 Titular/es:

**ONCORENA AB (100.0%)**

**Erik Dahlbergsgatan 11A**

**411 26 Gothenburg , SE**

72 Inventor/es:

**NYSTRÖM, JENNY;**

**BUVALL, LISA;**

**NILSSON, ULF y**

**HARALDSSON, BÖRJE**

74 Agente/Representante:

**ES 2 401 671 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

N,N' Dióxidos de 3,3',4,4'-tetrahidroxi-2,2'-bipiridina para el tratamiento de carcinoma de células renales

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al tratamiento del cáncer. Más específicamente esta invención se refiere al uso de N,N'-dióxidos de 3,3',4,4'-tetrahidroxi-2,2'-bipiridina, especialmente N,N'-dióxido de 3,3',4,4'-tetrahidroxi-2,2'-bipiridina (orelanina), para el tratamiento de cáncer renal, particularmente carcinoma de células renales procedente de células tubulares proximales renales.

Antecedentes de la invención

El cáncer aparece en más de 100 diferentes formas que afectan a casi todas las partes del cuerpo. Durante toda la vida, las células sanas en el cuerpo se dividen, crecen y se reemplazan a sí mismas de un modo controlado. El cáncer resulta cuando los genes que dictan esta división celular funcionan de manera incorrecta y las células comienzan a multiplicarse y crecer fuera de control. Una masa o grupo de estas células anómalas se denomina tumor. No todos los tumores son cancerosos. Los tumores benignos, tales como lunares, dejan de crecer y no se propagan a otras partes del cuerpo. Sin embargo, los tumores cancerosos o malignos, siguen creciendo y sofocan las células sanas, interfieren con funciones corporales y extraen nutrientes de los tejidos corporales. Los tumores malignos pueden propagarse a otras partes del cuerpo a través de un proceso denominado metástasis. Las células del "tumor madre" se desprenden, migran a través de los vasos sanguíneos o linfáticos o al interior del pecho, abdomen o pelvis, dependiendo del tumor, y forman eventualmente nuevos tumores en otra parte en el cuerpo.

El cáncer en el riñón constituye aproximadamente el 3% de todos los tumores sólidos. Aproximadamente el 85% de los tumores renales se clasifican como carcinoma de células renales (RCC). Aproximadamente el 80% de los RCC diagnosticados se originan a partir de las células epiteliales que recubren las partes proximales de los ductos que forman la orina de los riñones, los túbulos. Debido a su aspecto en el microscopio, se conoce este tipo de cáncer o bien como carcinoma de células claras renales (RCCC, 65%) o carcinoma papilar de células renales (RPCC, 15%). Aunque el RCCC y el RPCC constituyen el 80% de los RCC diagnosticados, son responsables de cerca del 100% de las muertes por carcinoma de células renales.

El factor más importante en la predicción del pronóstico es el estadio. El estadio describe el tamaño del cáncer y cómo de profundamente se ha propagado más allá del riñón. El sistema de estadificación del Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC, *American Joint Committee on Cancer*) se conoce como sistema TNM. La letra T seguida por un número de desde 1 hasta 3 describe el tamaño del tumor y la propagación a tejidos vecinos. Los números de T más altos indican un tumor mayor y/o una propagación más extensiva a tejidos cerca del riñón. La letra N seguida por un número de desde 0 hasta 2 indica si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cerca del riñón y, si es así, cuantos están afectados. La letra M seguida por 0 ó 1 indica si el cáncer se ha propagado o no a órganos distantes.

Estadio I: El tumor es de 7 cm (aproximadamente 2 3/4 pulgadas) o menor, y se limita al riñón. No hay propagación a ganglios linfáticos u órganos distantes.

45 Estadio II: El tumor es mayor de 7,0 cm pero aún se limita al riñón. No hay propagación a ganglios linfáticos u órganos distantes.

Estadio III: Incluye tumores de cualquier tamaño, con o sin propagación al tejido graso alrededor del riñón, con o sin propagación a las venas de gran calibre que conducen desde el riñón hasta el corazón, con propagación a un ganglio linfático cercano, pero sin propagación a ganglios linfáticos distantes u otros órganos. El estadio III también incluye tumores con propagación a tejido graso alrededor del riñón y/o propagación a las venas de gran calibre que conducen desde el riñón hasta el corazón, que no se han propagado a ningún ganglio linfático u otros órganos.

55 Estadio IV: Este estadio incluye cualquier cáncer que se ha propagado directamente a través del tejido graso y el tejido similar al ligamento de la fascia que rodea el riñón. El estadio IV también incluye cualquier cáncer que se ha propagado a más de un ganglio linfático cerca del riñón, a cualquier ganglio linfático no cerca del riñón o a cualquier otro órgano tal como los pulmones, hueso o cerebro.

Definiciones detalladas de cáncer de células renales, categorías T, N, M, y agrupaciones de estadio:

Tumor primario (T):

TX: No puede evaluarse el tumor primario

5

T0: Sin evidencia de tumor primario

T1: Tumor de 7 cm o menos, limitado al riñón

10

T2: Tumor superior a 7 cm, limitado al riñón

T3: El tumor se extiende a las venas principales/tejido adrenal/perirrenal; no más allá de la fascia de Gerota

T3a: El tumor invade la grasa adrenal/perirrenal

15

T3b: El tumor se extiende a la(s) vena(s) renal(s) o a la vena cava por debajo del diafragma

T3c: El tumor se extiende a la vena cava por encima del diafragma

20

T4: El tumor invade más allá de la fascia de Gerota

N - Ganglios linfáticos regionales

NX: No pueden evaluarse los ganglios regionales

25

N0: Sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales

N1: Metástasis en un único ganglio linfático regional

N2: Metástasis en más de un ganglio linfático regional

30

M – Metástasis distante

MX: No puede evaluarse la metástasis distante

M0: Sin metástasis distante

35

M1: Metástasis distante

Como regla general, el cáncer en estadio I o II se trata mediante extirpación quirúrgica del riñón afectado y el pronóstico para la recuperación es bueno. Por el contrario, los cánceres renales de estadio III o IV están asociados con tasas de supervivencia muy bajas, y el Instituto Nacional del Cáncer declara en su sitio web que “prácticamente ningún paciente con cáncer de células renales en estadio IV puede curarse.”

40

El Instituto Nacional del Cáncer estima que 49.096 nuevos casos de cáncer renal fueron diagnosticados en los EE.UU. en 2009 (16/10<sup>5</sup> ciudadanos) con 11.033 muertes resultantes (3,6/10<sup>5</sup> ciudadanos). Los números correspondientes para la Unión Europea (2006) son 65.051 diagnósticos (7,8/10<sup>5</sup> ciudadanos) y 27.326 muertes (3,3/10<sup>5</sup> ciudadanos) (Observatorio Europeo del Cáncer: <http://eu-cancer.iarc.fr/cancer-19-kidney.html,en>). Las estimaciones a nivel mundial (2006) son 209.000 casos diagnosticados (3,2/10<sup>5</sup> ciudadanos) y 102.000 muertes (1,6/10<sup>5</sup> ciudadanos) (Gupta *et al.* Cancer Treat. Rev. 34, 193-205; 2008). La incidencia aparentemente mayor en los EE.UU. se debe al hecho de que el NCI notifica conjuntamente el cáncer de la pelvis renal (que es relativamente fácil de tratar) con los carcinomas de células renales. La incidencia global y tasas de mortalidad menores se deben probablemente, al menos en parte, al bajo diagnóstico en grandes áreas del Tercer Mundo.

45

50

El principal problema con la técnica convencional es que, tal como se mencionó anteriormente, el resultado para cualquier paciente diagnosticado con cáncer renal está dictado en gran medida por el momento del diagnóstico. Si se diagnostica la enfermedad antes de que se haya propagado el tumor fuera del riñón la probabilidad de supervivencia es buena, de lo contrario la mayoría de los pacientes muere por la enfermedad. El principal motivo para eso es que el carcinoma de células renales no responde a ninguna terapia convencional con fármacos citostáticos y/o citotóxicos, tales como cisplatino, carboplatino, docetaxel, pacli-

55

taxel, fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, irinotecán, topotecán, etopósido, mitomicina, gefitinib, vincristina, vinblastina, doxorubicina, ciclofosfamida, celecoxib, rofecoxib y/o valdecoxib.

5 Diversas soluciones se describen en la técnica anterior. La quimioterapia convencional contra carcinoma de células renales está contraindicada en general debido a baja eficacia y efectos secundarios extensivos. Por tanto se han buscado modalidades de tratamiento alternativo, y pueden dividirse en diversas categorías:

1) Antiangiogénesis. En esta estrategia se privó al tumor de nutrientes y oxígeno a través de la inhibición de formación de los vasos sanguíneos necesarios para el suministro al tejido tumoral. Esto puede lograrse de diversas maneras: 1a) inhibición de factores de crecimiento circulantes, tales como VEGF, PDGF y PIGF, mediante tratamiento con anticuerpos dirigidos contra estos factores de crecimiento; 1b) bloqueo de receptores para factores de crecimiento vascular en células diana con anticuerpos dirigidos contra los receptores; y 1c) tratamiento con moléculas más pequeñas que interfieren con la función del receptor de tal manera que la unión de un factor de crecimiento vascular a su receptor no provoca el efecto angiogénico fisiológico.

15 2) Tratamiento inmunomodulador. Esta estrategia intenta estimular el sistema inmunitario endógeno para reconocer las células tumorales como extrañas y empezar a luchar contra ellas. La estimulación inmunitaria como tratamiento contra el cáncer renal sigue dos rutas principales: 2a) tratamiento con interleucina-2 (IL-2); y 2b) terapia con interferón-alfa (IFN $\alpha$ ).

20 Todas las estrategias de tratamiento alternativo mencionadas anteriormente mejoran significativamente el periodo de vida de algunos pacientes con cáncer renal en un estadio avanzado. Sin embargo, el efecto es del orden de sólo pocos meses, y el tratamiento está asociado con numerosos efectos secundarios graves. Muy a menudo el tumor se adapta al tratamiento que entonces debe interrumpirse. Esto va seguido por una tasa acelerada de crecimiento tumoral. Estrategias recientes para el tratamiento de cáncer renal se han revisado por Garcia *et al.* ("Recent progress in the management of advanced renal cell carcinoma." CA Cancer. J. Clin. 57(2): 112-25 (2007)) y por Atkins *et al.* ("Innovations and challenges in renal cell carcinoma: summary statement from the Second Cambridge Conference." Clin. Cancer. Res. 13(2 Pt 2): 667s-670s (2007)).

30 Una revisión de la bibliografía indica que muchos de los enfoques terapéuticos se originan de la identificación de marcadores de cáncer más o menos específicos y el uso de estos marcadores para provocar una respuesta inmunitaria del huésped dirigida contra el tejido tumoral invasor. Así, el documento US2006134708 da a conocer varios marcadores moleculares de cáncer de riñón y urotelial, concretamente IGFBP-3 (proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a insulina), ANGPTL4 (proteína 4 similar a angiopoyetina) y ceruloplasmina, así como anticuerpos monoclonales dirigidos contra dichos marcadores, con fines de diagnóstico. Se describe el uso a nivel de péptido y ácido nucleico de compuestos antisentido dirigidos contra los marcadores dados a conocer. Además, se contempla el uso de anticuerpos monoclonales contra los marcadores, conjugándose los anticuerpos con agentes citotóxicos, como realización terapéutica asociada con efectos secundarios menos graves de los agentes citotóxicos debido al direccionamiento proporcionado por el anticuerpo (también conocido como concepto "panacea"). En el documento CN1359941 se adopta una estrategia similar, basada en diferentes antígenos asociados a tumor.

45 El documento US6403373 da a conocer moléculas de ácido nucleico asociadas con cáncer de colon, renal y de estómago, cuyos productos peptídicos dan lugar a la producción de anticuerpo en un huésped. Se contempla el uso de los péptidos en un enfoque de vacuna. El documento EP0160250 da a conocer anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de carcinoma renal y menciona la posibilidad de conjugar éste con diversos agentes citotóxicos.

50 El documento WO2007059082 da a conocer la aparición del antígeno TIM-1 (célula T, inmunoglobulina o dominio mucina 1), que se asocia con la proliferación celular, en cáncer de ovarios y renal. Se enseña el uso de anticuerpos producidos contra TIM-1 para el tratamiento de cáncer de ovarios y renal, así como la conjugación de agentes terapéuticos (toxinas, radioisótopos o agentes quimioterápicos) con dichos anticuerpos como medio de destrucción dirigida de células tumorales.

55 El documento US6440663 da a conocer varios genes expresados por células de cáncer renal, cuyos productos conducen a la producción de anticuerpos en el huésped. Se describen diversos enfoques para provocar o aumentar una respuesta inmunitaria en el huésped hacia el tejido que expresa los genes dados a conocer, incluyendo la producción de células T citotóxicas y la transfección de células huésped con los ge-

nes dados a conocer o fragmentos de los mismos, seguido por la reintroducción de dichas células en el huésped.

5 El documento US 2005261178 da a conocer la administración conjunta de un anticuerpo monoclonal (G250), dirigido contra un antígeno (anhidrasa carbónica IX) expresado en la mayoría de los cánceres renales, y las citocinas interleucina-2 o interferón- $\alpha$ . Las citocinas se administraron en dosis inferiores que las usadas cuando se trata sólo con citocinas. La estabilización de la enfermedad durante 22 semanas o más, o una "respuesta objetiva", se logró en aproximadamente el 30% de los pacientes en un grupo que padecía cáncer renal avanzado.

10 Otros enfoques se basan en el uso de sustancias terapéuticas conocidas en regímenes de nuevo tratamiento. Por ejemplo, el documento WO2007044015 da a conocer el uso de compuestos de dimetanosulfonato conocidos anteriormente, en particular NSC-281612, según un nuevo protocolo de administración con el fin de tratar el cáncer renal. Cuando se somete a prueba en xenoinjertos en ratones desnudos, la administración de NSC-281612 condujo, en algunos casos, a la erradicación aparentemente completa de la masa tumoral.

15 El documento JP2001288110 da a conocer la conjugación de interferón- $\alpha$  con polietilenglicol (PEG) en un intento por aumentar la semivida en circulación y disminuir la dosis terapéuticamente eficaz más baja.

20 El documento RU2188026 da a conocer un régimen de poliquimioterapia con vincristina, adriamicina y de-po-provera. Esto se reivindica para aumentar el periodo libre de recidivas y disminuir la formación de metástasis.

25 Finalmente, en algunos casos, la terapia sugerida se basa en nuevas sustancias originales. Así, el documento WO2004075887 da a conocer el uso de 1-(2-cloroetil)-1-nitroso-3-(2-hidroxi)etil)urea (HECNU) para el tratamiento de muchos tipos de cáncer, incluyendo cáncer renal. La característica principal de la HECNU es una solubilidad en agua mejorada en comparación con el compuesto correspondiente conocido anteriormente, bis-(2-cloroetil)-1-nitroso-urea (BCNU).

30 El documento EP1712234 da a conocer el uso de derivados de 4-piridilmetil-ftalazina como inhibidores del receptor de VEGF en el tratamiento de cáncer renal, especialmente para la inhibición de crecimiento metastásico. Se encontró que la administración conjunta de los derivados de 4-piridilmetil-ftalazina con cualquiera de una pluralidad de agentes quimioterápicos convencionales tenía un efecto sinérgico, a pesar de que las células tumorales no respondan a la quimioterapia sola. Además, se asoció la terapia de combinación con efectos secundarios visiblemente menores.

35 Suthpin *et al.* ("Targeting the Loss of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene in Renal Carcinoma Cells", *Cancer. Res.* 67(12), 5896-5905 (2007)) estudiaron el efecto selectivo de cromomicina A3 en cánceres renales que no expresaban el gen VHL (este gen que suprime tumores está ausente en aproximadamente el 70% de todos los cánceres de células claras renales). La cromomicina A3 retardó significativamente el crecimiento tumoral en ratones desnudos sometidos a xenoinjerto sin afectar al tejido renal normal, que expresa el gen VHL.

45 La invención en el presente documento utiliza orelanina (fórmula I), que es una toxina renal selectiva que se produce en cantidades relativamente grandes en varias especies de hongos de la familia *Cortinarius*. La intoxicación con orelanina tras la confusión de hongos *Cortinarius* con setas comestibles se produce regularmente en toda Europa, Rusia y América del Norte. Tras la ingestión de hongos que contienen orelanina, hay un periodo de pocos días hasta 3 semanas sin síntomas o sólo síntomas leves, similares a los de la gripe.

50 La siguiente fase, cuando en general se busca ayuda médica, se caracteriza por uremia debido a insuficiencia renal aguda. A pesar de muchas descripciones de envenenamiento con orelanina en la bibliografía científica, no se han notificado otros efectos de la orelanina aparte de la toxicidad renal recién mencionada (Danel VC, Saviuc PF, Garon D: Main features of *Cortinarius* spp. poisoning: a literature review. *Toxicon* 39, 1053-1060 (2001).). Lo más probable es que esta selectividad resida en el hecho de que la orelanina se

55 capta específicamente por un tipo de célula, es decir, las células epiteliales tubulares, particularmente las células epiteliales tubulares proximales (Prast H, Pfaller W: Toxic properties of the mushroom *Cortinarius orellanus* (Fries) II. Impairment of renal function in rats. *Arch Toxicol* 62, 89-96 (1988).). El mecanismo de toxina de la orelanina no se ha aclarado, y no hay ningún tratamiento disponible excepto diálisis de mantenimiento mientras se espera para ver si los riñones se recuperarán o no. El desenlace final depende de ma-

nera crítica de la cantidad de toxina ingerida, y, por regla general, la ingestión de un hongo proporciona problemas temporales, dos hongos conducen a pérdida permanente de parte de la función renal mientras que tres o más hongos dan como resultado la pérdida total de la función renal y necesidad para toda la vida de diálisis o terapia de reemplazo renal.

5

Los solicitantes han publicado recientemente un primer estudio del modo de acción de la orelanina en ratas sanas (Nilsson UA *et al.* The fungal nephrotoxin orellanine simultaneously increases oxidative stress and down-regulates cellular defenses. *Free Rad. Biol. Med.* 44:1562-9 (2008).). Este estudio muestra el estrés oxidativo aumentado en tejido renal cortical junto con la expresión drásticamente disminuida de varios genes antioxidantes clave. Durante este trabajo se descubrió que la especificidad aparentemente absoluta de la orelanina para células epiteliales tubulares renales podría extenderse teóricamente para abarcar estas células también después de la transformación en células cancerosas. Si se demuestra que es verdadera, una hipótesis de ese tipo significaría que la orelanina es un arma poderosa contra el cáncer renal de origen epitelial, con potencial curativo incluso en estadios avanzados y con metástasis en otros tejidos.

15

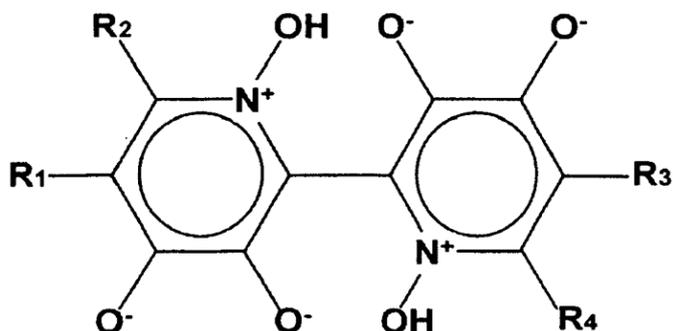
Siguiendo esta hipótesis, se descubrió sorprendentemente que de hecho la orelanina también se captó en células de cáncer renal humano y que las destruyó con gran eficacia tanto si se derivaban de un tumor primario como de tejido tumoral metastásico. La muerte celular avanzó durante muchos días tras la exposición temporal a orelanina, lo que indica que la toxina se captó activamente y se retuvo por las células.

20

#### Sumario de la invención

Un objeto principal de la presente invención es proporcionar un tratamiento para el cáncer renal originado a partir de células epiteliales, que implique administrar a un mamífero que lo necesita al menos un compuesto según la fórmula I.

25



Fórmula I

Otros objetos de la presente invención son proporcionar un compuesto según la fórmula I para su uso como medicamento y proporcionar un compuesto de fórmula I para su uso en el tratamiento de carcinoma de células renales.

30

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprenda al menos un compuesto según la fórmula I, que comprenda opcionalmente otros agentes con actividad anticancerígena, así como portadores y cualquier otro excipiente necesario para optimizar la eficacia de la composición.

35

Aún otro objeto es proporcionar un kit que contenga la composición anterior, en uno o más compartimentos individuales, junto con diluyentes y/o disolventes según sea necesario, de modo que la composición pueda prepararse fácilmente para su uso por la enfermera o médico de tratamiento.

40

#### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Observación de la viabilidad de células de 5 carcinomas de células renales humanos diferentes (tumores primarios y metástasis) durante 7 días tras 24 h de exposición a orelanina 400  $\mu$ M (medio de cultivo 100  $\mu$ g/ml). La viabilidad se calcula dividiendo el número de células vivas en muestras tratadas entre el número de células vivas en muestras control (n=6). El área gris en el gráfico representa el periodo de incubación con orelanina (24 h). Los días siguientes se cultivaron las células en medio de cultivo completo libre de orelanina. Se cambió el medio en cada medición de viabilidad.

45

Figura 2: La toxicidad de la orelanina hacia células de carcinoma renal humano (cepa 786-0) una semana tras la incubación con orelanina según los mismos parámetros que en la figura 1. La micrografía de la izquierda muestra células que se han expuesto a vehículo, y la micrografía de la derecha muestra células expuestas a orelanina 400  $\mu$ M durante 24 h. Se tomaron ambas fotografías con el mismo aumento, y una semana tras la incubación con orelanina/vehículo.

Figura 3: Efecto dosis/respuesta de diferentes concentraciones de orelanina en el medio de cultivo de carcinomas de células renales humanos (786-0 y SKRC7). Se observa una clara correlación entre la dosis de orelanina y la muerte celular en el intervalo de concentración 5 - 200  $\mu$ g/ml.

Figura 4: Efecto de la administración repetida de una dosis inferior de orelanina. La administración de una segunda dosis en el extremo inferior del intervalo de dosis/respuesta (20  $\mu$ g/ml) 24 h tras la primera dosis condujo a una fuerte disminución en el número de células viables, mientras que la administración de la segunda dosis a las 72 h tuvo un efecto considerablemente menor, pero todavía significativo. El primer caso es equivalente a una exposición prolongada de las células (48 h), mientras que en el segundo caso se ha dejado que las células se recuperen en el medio libre de orelanina durante dos días entre las dosis. La viabilidad se midió 96 h tras la adición de la primera dosis de orelanina.

Figura 5: Efectos de la orelanina sobre el ciclo celular en carcinoma de células renales (786-0 y SKRC-52) (inmunotransferencia de tipo Western). Los niveles de proteína del inhibidor del ciclo celular p21 se regulan por incremento gradualmente con un máximo de 6 h de incubación. Tras 24 h, la forma fosforilada de estimulación de ciclo celular de la proteína del retinoblastoma (Rb) ha desaparecido (se muestran dos sitios de fosforilación diferentes). Ambos de estos efectos convergen en una parada del ciclo celular en el punto de comprobación G1/S. Simultáneamente, la pérdida del factor estimulante cdc2 detiene el ciclo celular en el punto de comprobación G2/M, impidiendo el inicio de la división celular.

Figura 6: Inducción de apoptosis mediante orelanina en células de carcinoma renal (786-0): Efectos de la proteína. Se reguló por incremento fuertemente la ruta p38 apoptótica (f-p38) tras exposición a orelanina (OR), y se detectó apoptosis en forma de caspasa 3 escindida. La regulación por incremento fuerte de ERK1/2 tras 24 h (f-ERK1/2) se interpreta como un intento de las células por contrarrestar las influencias apoptóticas de la orelanina. Para ERK 1/2 y p38, deben compararse las razones de proteína fosforilada (f) con respecto a proteína total. La caspasa 3 escindida debe compararse con el control de carga, beta actina.

Figura 7: Inducción de apoptosis mediante orelanina en células de carcinoma renal (SKRC-52): efectos de ARNm. El análisis de RT-PCR de la expresión de ARNm de los mediadores de apoptosis PUMA, ligando Fas (FasL) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF) reveló una regulación por incremento drástica en los tres casos. Sólo se observaron pequeños cambios en la expresión de ARNm receptor. Se comparan las células con las células control incubadas sin orelanina.

Figura 8: Apoptosis en cáncer de células claras humano (SKRC52) durante la incubación con orelanina. Los signos típicos de apoptosis, vacuolización y contracción celular son evidentes ya tras 4 h de incubación, y se agravan adicionalmente tras 24 h.

#### Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas de la misma

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de N-óxido de piridina y N,N-dióxido de bupiridina para tratar cáncer renal administrando las composiciones farmacéuticas a un paciente que padece o es susceptible de cáncer renal. La invención en el presente documento también incluye un kit para tratar un paciente que padece o es susceptible de cáncer renal.

La presente invención proporciona el tratamiento a un paciente que padece o es susceptible de carcinoma de células renales que comprende la etapa de administrar al paciente un compuesto según la fórmula I tal como se definió anteriormente, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto.

Los compuestos de fórmula I administrados a un paciente incluyen los compuestos en los que R1, R2, R3 y/o R4 no interfieren sustancialmente con la citotoxicidad de orelanina (R1 = R2 = R3 = R4 = hidrógeno). Por tanto, R1, R2, R3 y/o R4 se seleccionan de hidrógeno, amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcanol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, al-

coxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cada uno de los cuales puede estar sustituido adicionalmente con grupos que incluyen pero no se limitan a amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo. En una realización preferida de la presente invención, el compuesto de fórmula I es orelanina, es decir R1 = R2 = R3 = R4 = hidrógeno.

5 En una realización del tratamiento según la presente invención de pacientes que padecen o son susceptibles de cáncer renal, el compuesto de fórmula I administrado al paciente es un solvato, hidrato o sal farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, una sal farmacéuticamente aceptable es una sal de ácido o base que en general se considera en la técnica que es adecuada para su uso en  
10 contacto con los tejidos de seres humanos o animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones. Tales sales incluyen sales de ácido orgánico y mineral de residuos básicos, tales como aminas. Sales farmacéuticas específicas incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos tales como clorhídrico, fosfórico, bromhídrico, málico, glicólico, fumárico, sulfúrico, sulfámico, sulfanílico, fórmico, toluenosulfónico, metanosulfónico, bencenosulfónico, etanodisulfónico, 2-hidroxiethylsulfónico, nítrico, benzoico, 2-acetoxibenzoico, cítrico, tartárico, láctico, esteárico, salicílico, glutámico, ascórbico, pamoi-  
15 co, succínico, fumárico, maleico, propiónico, hidroximaleico, yodhídrico, fenilacético, alcanico tal como acético, HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH en el que n es 0-4, y similares.

20 En el tratamiento de cáncer renal proporcionado en el presente documento, el compuesto de fórmula I puede administrarse en una dosis única, en una serie de dosis diarias o en un formato de dosificación intermitente (por ejemplo, una pluralidad de dosis o secuencias de dosis administradas separadas entre 1 y 30 días, separadas entre 1 y 14 días o separadas entre 1 y 7 días). En cierto tratamiento, el protocolo de administración y el compuesto de fórmula I se seleccionan para proporcionar al menos una reducción del 50% en el tamaño del tumor, o más preferiblemente al menos una reducción del 75%, el 90% o el 95% en tamaño  
25 del tumor tras la finalización del protocolo de administración, mientras que en cierto otro tratamiento, la selección del protocolo de administración y el compuesto de fórmula I dan como resultado una reducción del 95% en el tamaño del tumor, una reducción del 99% en el tamaño del tumor o una eliminación sustancialmente completa del tumor. En aquel tratamiento que comprende un protocolo de administración de dosis única, se administra una dosis única de entre 1 mg/kg y 100 mg/kg de un compuesto según la fórmula (I) o  
30 una cantidad molar equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo al paciente, mientras que una dosis única preferida comprende entre 2 mg/kg y 25 mg/kg, lo más preferiblemente entre 5 mg/kg y 15 mg/kg de un compuesto de fórmula I o una cantidad molar equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra al paciente.

35 En cierto otro tratamiento de cáncer renal, un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra al paciente que padece o es susceptible de cáncer renal en dos o más dosis. Normalmente las dosis se administran diariamente o de manera intermitente (por ejemplo, con al menos un día de no administración que separa las dosis secuenciales). En cierto tratamiento en el que el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra en una pluralidad de dosis,  
40 cada dosis comprende entre 0,5 mg/kg y 10 mg/kg del compuesto, o más preferiblemente, cada dosis comprende entre 1 mg/kg y 5 mg/kg, o lo más preferiblemente 2 mg/kg del compuesto o sal de fórmula I.

En cierto tratamiento en el que se administran dosis secuenciales de manera intermitente, las dosis secuenciales se administran separadas entre dos y siete días, en aún otro tratamiento que comprende la administración intermitente del compuesto o sal de fórmula I, el compuesto se administra al paciente en tres, cuatro,  
45 cinco o seis o más dosis y en el que cada dosis se administra separada entre tres y cinco días, en aún otro tratamiento, se administran al paciente cuatro, cinco o seis o más dosis administradas separadas entre tres y cuatro días, en el que cada dosis comprende entre 1 mg/kg y 20 mg/kg de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, preferiblemente 2 - 10 mg/kg y lo más preferiblemente 5  
50 mg/kg. En cierto otro tratamiento de cáncer renal, se administra al paciente una dosis diaria de un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, durante al menos dos días. Las dosis diarias típicas administradas a pacientes son de entre 0,1 y 10 mg/kg, preferiblemente entre 1 y 5 mg/kg, y lo más preferiblemente 2 mg/kg. Los protocolos terapéuticos comprenden normalmente la administración diaria del compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, entre 5 y 30 días, o  
55 preferiblemente entre 10 y 20 días, o de la manera más preferible aproximadamente 14 días.

En ciertos casos, puede ser deseable realizar una pluralidad de protocolos de administración intermitente, protocolos de administración diaria o una combinación de los mismos, tal como se describió anteriormente, en combinación con los periodos de reposo y/o recuperación. Así, en ciertos casos, puede ser deseable

5 administrar un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según un método de administración diaria o intermitente proporcionado en el presente documento, medir la respuesta tumoral con respecto a la terapia, y entonces realizar terapias de administración diaria o intermitente posteriores según sea necesario para eliminar o reducir adicionalmente el tamaño de los tumores de cáncer renal. Tales estrategias de administración se conocen bien por el experto en el campo de oncología.

10 En una realización particularmente preferida de la presente invención un paciente que padece carcinoma de células renales se trata con la sustancia según la fórmula 1 de la presente invención mediante inyecciones diarias de 0,5 – 5 mg de orelanina/kg de peso corporal, lo más preferiblemente 2 mg de orelanina/kg de peso corporal, durante 7 - 21 días consecutivos, lo más preferiblemente 14 días consecutivos. De una a 5 horas tras cada inyección diaria de un compuesto según la fórmula 1, de la manera más preferible aproximadamente 2 horas tras tal inyección, se somete el paciente a hemodiálisis durante 1-5 h, de la manera más preferible aproximadamente 2 h, con el fin de eliminar cualquier compuesto según la fórmula 1 que se ha captado en el tejido tumoral y minimizar de ese modo cualquier efecto secundario indeseado que podría producirse en el espacio extracelular.

15 Las dosis y los regímenes de dosis preferidos descritos anteriormente se basan en un ser humano que pesa 70 kg y que padece carcinoma de células renales con una carga tumoral de aproximadamente 1 kg. Sin embargo, como se conoce fácilmente por el experto en el campo de medicina del cáncer, tales dosis preferidas y regímenes de dosis se rigen en gran medida por las características del paciente tales como edad, sexo, peso, estado general y, sobretodo, la carga tumoral del paciente individual y respuesta al tratamiento. Como siempre, la última responsabilidad para elegir la dosis y estrategia de tratamiento apropiadas recae en el médico a cargo del paciente.

25 La invención proporciona el tratamiento de pacientes que padecen o son susceptibles de carcinoma de células renales. En cierto tratamiento, el tumor que va a tratarse se localiza en uno o ambos de los riñones del paciente. En cierto otro tratamiento, el carcinoma de células renales ha metastatizado, por ejemplo, al menos un tumor de carcinoma de células renales está presente en al menos un tejido no de riñón. Normalmente el tratamiento proporcionado en el presente documento es adecuado en pacientes que padecen o son susceptibles de tumores de carcinoma de células renales que están presentes en los riñones, en tejidos no de riñón o en una combinación de los mismos. En una realización preferida, los tumores están presentes en tejidos no de riñón o en una combinación de tejidos de riñón y no de riñón. El tratamiento proporcionado por la presente invención contempla cualquier vía de administración que pueda proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I en la proximidad del tumor. En cierto tratamiento preferido proporcionado en el presente documento, el compuesto de fórmula I, o una composición farmacéutica que comprende el mismo se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal. Normalmente el compuesto de fórmula I, o una composición farmacéutica que comprende el mismo se administra por vía intravenosa.

40 En otro aspecto, la invención proporciona compuestos de fórmula I, en la que R1, R2, R3 y/o R4 no interfieren sustancialmente con la citotoxicidad de la orelanina (R1 = R2 = R3 = R4 = hidrógeno), para su uso como medicamento. La invención también proporciona el uso de compuestos de fórmula I, en la que R1, R2, R3 y/o R4 no interfieren sustancialmente con la citotoxicidad de la orelanina (R1 = R2 = R3 = R4 = hidrógeno), como medicamento. R1, R2, R3 y/o R4 se seleccionan de hidrógeno, amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcanol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cada uno de los cuales puede estar sustituido adicionalmente con grupos seleccionados de amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo. En una realización preferida de la presente invención, el compuesto de fórmula I es orelanina, es decir R1 = R2 = R3 = R4 = hidrógeno. Otras realizaciones preferidas de este aspecto de la invención resultan evidentes a partir de la descripción detallada.

55 Aún en otro aspecto, la invención proporciona compuestos de fórmula I, en la que R1, R2, R3 y/o R4 no interfieren sustancialmente con la citotoxicidad de la orelanina (R1 = R2 = R3 = R4 = hidrógeno), para su uso en el tratamiento de carcinoma de células renales. La invención también proporciona el uso de compuestos de fórmula I, en la que R1, R2, R3 y/o R4 no interfieren sustancialmente con la citotoxicidad de la orelanina (R1 = R2 = R3 = R4 = hidrógeno), para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de carcinoma de células renales. R1, R2, R3 y/o R4 se seleccionan de hidrógeno, amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcanol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cada uno de los cuales puede estar sustituido adicionalmente con

grupos seleccionados de amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo. En una realización preferida de la presente invención, el compuesto de fórmula I es orelanina, es decir  $R1 = R2 = R3 = R4 =$  hidrógeno. Otras realizaciones preferidas de este aspecto de la invención resultan evidentes a partir de la descripción detallada.

5 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto según la fórmula (I), en la que  $R1, R2, R3$  y/o  $R4$  no interfieren sustancialmente con la citotoxicidad de la orelanina ( $R1 = R2 = R3 = R4 =$  hidrógeno). Así,  $R1, R2, R3$  y/o  $R4$  son hidrógeno, amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo, alquilo  $C_1-C_6$ , alquenilo  $C_1-C_6$ , alquinilo  $C_1-C_6$ , alcanol  $C_1-C_6$ , alquenol  $C_1-C_6$ , alcoxilo  $C_1-C_6$ , alquenoxilo  $C_1-C_6$ , cada uno de los cuales puede estar sustituido adicionalmente con grupos seleccionados de amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo. En una realización preferida de la presente invención, el compuesto de fórmula I es orelanina, es decir  $R1 = R2 = R3 = R4 =$  hidrógeno.

15 En ciertas otras composiciones farmacéuticas, el compuesto de fórmula I se incorpora en la composición como solvato, hidrato o sal farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, una sal farmacéuticamente aceptable es una sal de ácido o base que en general se considera en la técnica que es adecuada para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos o animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación. Tales sales incluyen sales de ácido orgánico y mineral de residuos básicos tales como aminas. Las sales farmacéuticas específicas incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos tales como clorhídrico, fosfórico, bromhídrico, málico, glicólico, fumárico, sulfúrico, sulfámico, sulfanílico, fórmico, toluenosulfónico, metanosulfónico, bencenosulfónico, etanodisulfónico, 2-hidroxietilsulfónico, nítrico, benzoico, 2-acetoxibenzoico, cítrico, tartárico, láctico, esteárico, salicílico, glutámico, ascórbico, pamoico, succínico, fumárico, maleico, propiónico, hidroximaleico, yodhídrico, fenilacético, alcanoico tal como acético,  $HOOC-(CH_2)_n-COOH$  en el que  $n$  es 0-4.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente invención son adecuadas para su uso en cualquier vía de administración contemplada por el tratamiento en el que se usarán las composiciones. Los compuestos de la invención según la fórmula I y las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse a un sujeto por una variedad de vías incluyendo parenteral (incluyendo intravenosa, subcutánea, intramuscular e intradérmica), tópica (incluyendo bucal, sublingual), oral, nasal. En ciertas composiciones farmacéuticas preferidas proporcionadas en el presente documento, la composición farmacéutica se formula para la administración mediante inyección intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. Normalmente la composición farmacéutica se formula para la administración mediante inyección intravenosa.

35 En ciertas vías de administración parenteral, la composición farmacéutica es una solución salina estéril que comprende entre 0,1 mg/ml y 25 mg/ml del compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Ciertas composiciones farmacéuticas preferidas para administración parenteral comprenden entre 0,5 mg/ml y 10 mg/ml del compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una solución salina que comprende opcionalmente uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables.

45 En ciertas composiciones farmacéuticas preferidas, la composición comprende entre 25 mg y 5000 mg o entre 5 mg y 2500 mg del compuesto según la fórmula (I) o una cantidad molar equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En ciertas otras composiciones farmacéuticas de la invención, la composición comprende entre 1 mg y 1500 mg del compuesto según la fórmula (I) o una cantidad molar equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Aún otras composiciones farmacéuticas se formulan para comprender 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg o 100 mg de un compuesto de fórmula I o una cantidad molar equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

50 En cierto tratamiento del paciente que padece o es susceptible de cáncer, la administración del compuesto según la fórmula I a un paciente que padece o es susceptible de cáncer reduce el tamaño del tumor en al menos el 50% o más preferiblemente en al menos aproximadamente el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o aproximadamente el 95%. En cierto otro tratamiento del paciente que padece cáncer, la administración del compuesto según la fórmula I a un paciente que padece cáncer reduce el tamaño del tumor en al menos el 99% o reduce el tamaño del tumor hasta que no quede tumor detectable.

Ciertos tratamientos preferidos de pacientes que padecen cáncer incluyen tratamiento o prevención de cáncer u otros trastornos tumorales en pacientes mamíferos incluyendo ganado, animales de compañía (perros, gatos, caballos y similares), primates y seres humanos.

5 El tratamiento de la invención incluye en general la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de fórmula I. En el presente tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para reducir el tamaño de los tumores de carcinoma de células renales presentes en un paciente o para eliminar tumores del paciente. Los pacientes adecuados incluyen los sujetos que padecen un trastorno o enfermedad identificado/a en el presente documento. Los pacientes típicos para el tratamiento según la invención incluyen mamíferos, particularmente primates, especialmente seres humanos. Otros sujetos adecuados incluyen animales de compañía domesticados tales como un perro, gato, caballo y similares, o un animal de ganado tal como ganado bovino, cerdo, oveja.

10 El tratamiento preferido de la invención incluye identificar y/o seleccionar un sujeto (por ejemplo mamífero, particularmente ser humano) que padece un estado dado a conocer en el presente documento, particularmente un sujeto que padece uno o más cánceres. Una composición farmacéutica de la invención también puede estar envasada junto con instrucciones (es decir por escrito, tal como una hoja escrita) para el tratamiento de un cáncer tal como se da a conocer en el presente documento, por ejemplo instrucción para el  
15 tratamiento de un sujeto que padece cáncer.

Los compuestos de la invención se administran de manera adecuada a un sujeto en una forma soluble en agua, por ejemplo, como sal farmacéuticamente aceptable de un ácido orgánico o inorgánico, por ejemplo, clorhidrato, sulfato, hemisulfato, fosfato, nitrato, acetato, oxalato, citrato, maleato, mesilato, etc. obtenido  
20 tras la transformación química apropiada. Además, cuando un grupo ácido está presente en el compuesto, puede emplearse una sal farmacéuticamente aceptable de una base orgánica o inorgánica, tal como una sal de amonio, o sal de una amina orgánica, o una sal de un metal alcalino o metal alcalinotérreo tal como una sal de potasio, calcio o sodio. Específicamente las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen las formadas con un catión no tóxico, preferiblemente un catión de metal alcalino tal como K o Na, un catión  
25 de metal alcalinotérreo tal como Mg o Ca, otro catión de metal no tóxico tal como Al o Zn o un catión de metaloide no tóxico tales como  $\text{NH}_4^+$ , piperazinio o 2-hidroxietilamonio. Ciertos compuestos preferidos adecuados para su uso en los métodos de la invención son suficientemente solubles en agua en forma neutra de tal manera que pueden administrarse sin generación previa de una sal farmacéuticamente aceptable.

30 Para los compuestos que contienen uno o más centros estereogénicos, por ejemplo, compuestos quirales, el tratamiento de la invención puede llevarse a cabo con un compuesto enantioméricamente enriquecido, un racemato o una mezcla de diastereómeros. Los compuestos enantioméricamente enriquecidos preferidos tienen un exceso enantiomérico del 50% o más, más preferiblemente el compuesto tiene un exceso enantiomérico del 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 98% o el 99% o más. Los compuestos de la invención  
35 según la fórmula I para su uso en los métodos de la invención pueden emplearse, o bien solos o bien en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos, como una composición farmacéutica en mezcla con excipientes convencionales, es decir, sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para una vía de administración deseada que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos activos y no son perjudiciales para el receptor de las mismas. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen pero no se limitan a agua, soluciones salinas, alcohol, aceites ve-  
40 getales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácido graso, ésteres de ácido graso de petro-  
45 etral, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona. Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y si se desea mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos activos.

Para aplicación parenteral, son particularmente adecuadas disoluciones, preferiblemente disoluciones acuosas o aceitosas así como suspensiones, emulsiones o implantes, incluyendo supositorios. Ampollas son do-  
50 sificaciones unitarias convenientes.

Para la aplicación enteral, son particularmente adecuados comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar o cápsulas que tienen talco y/o aglutinante portador de hidrato de carbono o similares, siendo el portador preferiblemente lactosa y/o almidón de maíz y/o almidón de patata. Puede usarse un jarabe, elixir o similar  
55 en el que se emplea un vehículo edulcorado. Pueden formularse composiciones de liberación sostenida, incluyendo aquéllas en las que el componente activo se protege con recubrimientos degradables de manera diferenciada, por ejemplo, mediante microencapsulación, recubrimientos múltiples. Comprimidos, cápsulas y jarabes u otros fluidos se prefieren en general para la administración oral.

Debe entenderse que además de los componentes mencionados anteriormente de manera explícita las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica con respeto al tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, los adecuados para la administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

5 Según ciertas realizaciones, un compuesto de fórmula I puede administrarse en combinación con otros compuestos, incluyendo por ejemplo, agentes quimioterápicos, agentes antiinflamatorios, agentes antipiréticos, agentes radiosensibilizantes, agentes radioprotectores, agentes urológicos, agentes antieméticos y/o agentes antidiarreicos, por ejemplo, cisplatino, carboplatino, docetaxel, paclitaxel, fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, irinotecán, topotecán, etopósido, mitomicina, gefitinib, vincristina, vinblastina, doxorubicina, ciclofosfamida, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, dexametasona, prednisona, prednisolona, hidrocortisona, acetaminofeno, misonidazol, amifostina, tamsulosina, fenazopiridina, ondansetrón, granisetron, alosetron, palonosetrón, prometazina, proclorperazina, trimetobenzamida, aprepi-  
 10 tant, difenoxilato con atropina y/o loperamida. En una realización preferida el compuesto según la fórmula I se administra en combinación con fármacos antiangiogénicos, incluyendo por ejemplo anticuerpos monoclonales dirigidos contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento pla-  
 15 centario (PIGF); e inhibidores de los receptores de VEGF y PIGF, incluyendo por ejemplo bevacizumab, so-  
 rafenib, PTK78, SU11248, AG13736, AEE788 y ZD6474. En otra realización el compuesto según la fórmula I se administra en combinación con fármacos inmunomoduladores, incluyendo por ejemplo interleucina-2  
 20 (IL-2) e interferón-alfa (IFN $\alpha$ ). Aún en otra realización el compuesto según la fórmula I se administra en combinación con fármacos que interfieren con la señalización de crecimiento celular, incluyendo por ejemplo inhibidores de la diana de mamífero de rapamicina (mTOR).

Aún en otras realizaciones de la presente invención los compuestos según la fórmula I se unen química-  
 25 mente a moléculas que potencian la selectividad diana incluso direccionando los compuestos de fórmula I específicamente a células cancerosas. Los ejemplos de tales moléculas incluyen (A) anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra marcadores que se producen específicamente o en números mayores en las células diana en comparación con el tejido renal normal, y (B) ligandos a receptores que se producen específicamente o en números mayores en las células diana en comparación con el tejido renal normal. Ta-  
 30 les moléculas de orientación, y técnicas para conjugadas con los compuestos según la fórmula I, se conocen en la técnica, y las reacciones de acoplamiento pueden realizarse por el experto sin experimentación excesiva.

El kit de la invención en el presente documento comprende al menos un portador farmacéuticamente acep-  
 35 table y de 50 a 3.500 mg de un compuesto según la fórmula I, o la cantidad molar equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se comentó anteriormente. En el kit el compuesto según la fórmula I o sal aceptable del mismo y el portador farmacéuticamente aceptable se ubican preferiblemente en compartimentos separados. El compuesto según la fórmula I está presente preferiblemente como sólido. Para la administración, el compuesto según la fórmula I o sal farmacéuticamente aceptable del mismo se  
 40 combina preferiblemente con el portador de modo que se disuelva completa o sustancialmente en el porta-  
 dor. El kit puede comprender entre 100 mg y 1.500 mg, y lo más preferiblemente entre 200 mg y 500 mg, del compuesto según la fórmula I o una cantidad equivalente de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

#### 45 Ejemplos

##### Ejemplo 1: Extracción y aislamiento de orelanina a partir de setas *Cortinarius*.

A. Método polar: Se pulverizaron 2 g de seta *Cortinarius* seca y entonces se extrajeron con metanol al 50%  
 50 durante 24 h a 25°C. Se centrifugó la mezcla y se retiró el sobrenadante hasta un volumen final de 5 ml. Tras la adición repetida de 5 vol de metanol frío, se formó un precipitado que se desechó hasta que se formó una disolución transparente. Se evaporó el disolvente, se disolvió el residuo en agua y se eliminaron sustancias apolares mediante extracción con éter de petróleo. Se cargó la fase polar en una columna Sephadex y se eluyó con etanol al 50%. Se cromatografiaron las fracciones resultantes en celulosa de capa fina, eluyendo con butanol:ácido acético:agua (3:1:1). Se identificó la orelanina como una banda fluorescente  
 55 a Rf 0,68.

B. Método apolar: Se sometieron a reflujo 4 g de seta *Cortinarius* en polvo durante 24 h en dietil éter y se desechó el disolvente. Se sometió a reflujo el residuo en metanol seguido por evaporación de disolvente y lavado con 20 ml de agua (6 h, 4°C). Entonces se disolvieron en etanol acuoso al 50% (pH 7,0). Se cargó la

mezcla en una columna Sephadex y se eluyó con etanol al 50%. Se cromatografiaron las fracciones resultantes en celulosa de capa fina, eluyendo con butanol:ácido acético:agua (3:1:1). Se identificó la orelanina como una banda fluorescente a Rf 0,68.

5 Ejemplo 2: Síntesis de orelanina

Se sintetizó orelanina a partir de 3-hidroxipiridina comercialmente disponible esencialmente tal como se describe por otros. (Tiecco M, Tingoli M, Testaferri L, Chianelli D y Wenkert E: Total synthesis of orellanine, the lethal toxin of Cortinarius orellanus Fries Mushroom. Tetrahedron 42, 1475-1485 (1986))

10 Ejemplo 3: La orelanina tiene un efecto tóxico específico sobre células de carcinoma de células renales humano *in vitro*.

Antecedentes y metodología.

15 Se cultivaron células recogidas de 5 carcinomas de células renales humanos diferentes (SKRC-52, 786-0, SKRC-17, SKRC-7 y SKRC-21), que representan tanto crecimientos de tumores madre como metastásicos, en condiciones convencionales. Cuando estaban aproximadamente al 70% de confluencia y en crecimiento rápido, se expusieron las células a un medio que contenía orelanina (400  $\mu$ M) durante 24 h. Entonces se cambió de nuevo el medio a medio completo regular y se observaron las células durante otros seis días.

Resultados y comentarios.

20 El efecto del tratamiento con orelanina descrito de las células se ilustra en la figura 1. Resulta evidente a partir de la figura que la orelanina era altamente tóxica para todos los tipos celulares sometidos a prueba. Además, la toxicidad no se vio afectada por la retirada de la orelanina del medio de cultivo tras la exposición inicial. Esto sugiere que la orelanina se acumula en las células y permanece en las mismas incluso cuando no hay orelanina extracelular presente. La figura 2 muestra el aspecto de las células antes y una semana después de 24 h de exposición a orelanina.

Ejemplo 4: Efecto dosis-respuesta de la orelanina

Antecedentes y metodología

30 Se cultivaron células recogidas de 2 carcinomas de células renales humanos diferentes (SKRC-7, 786-0), que representan tanto tumores madre como crecimientos metastásicos, en condiciones convencionales. Cuando estaban aproximadamente al 70% de confluencia y en crecimiento rápido, se expusieron las células a un medio que contenía diferentes concentraciones de orelanina (400  $\mu$ M) durante 24 h. Entonces se cambió de nuevo el medio a medio completo regular y se observaron las células durante otros seis días.

35 Resultados y comentarios

Tal como se observa en la figura 3, hay una correlación clara entre la concentración de exposición y la fracción de células que mueren. El intervalo de dosis-respuesta durante una única exposición de 24 h de orelanina está entre aproximadamente 5  $\mu$ g/ml y 200  $\mu$ g/l.

40 Ejemplo 5: Efectos de la administración repetida de dosis menores de orelanina

Antecedentes y metodología

45 Se cultivaron células recogidas del carcinoma de células renales humano 786-0 en condiciones convencionales. Cuando estaban aproximadamente al 70% de confluencia y en crecimiento rápido, se expusieron las células a medio que contenía una concentración baja de orelanina (20  $\mu$ g/ml) durante 24 h. Entonces se cambió el medio a medio nuevo que contiene o bien 20  $\mu$ g/ml de orelanina durante 24 h (barra del medio) o bien de nuevo a medio completo regular durante 48 h, seguido por otras 24 h en presencia de 20  $\mu$ g/ml de orelanina (barra más a la derecha).

Resultados y comentarios

50 La exposición repetida a orelanina, incluso en dosis en el límite inferior del intervalo de respuesta a una única exposición, produjo efectos tóxicos notables adicionales sobre células de cáncer renal.

Ejemplo 6: Efectos de la orelanina sobre otros tipos celulares

Antecedentes y metodología

55 Se cultivaron líneas celulares y células primarias procedentes de numerosos tejidos humanos (epitelio tubular, podocitos y células mesangiales de tejido renal, fibroblastos, macrófagos, endotelio aórtico, endotelio microvascular y endotelio del cordón umbilical, epitelio intestinal (duodenal, yeyunal, ileal y colónico) y condrocitos) en condiciones convencionales. Cuando estaban aproximadamente al 70% de confluencia y en crecimiento estable, se expusieron las células durante 24 h a medio que contenía orelanina en concentra-

ciones seleccionadas con el fin de lograr una respuesta a la dosis. Entonces se cambió de nuevo el medio a medio completo regular y se observaron las células durante otros seis días, seguido por determinación de la viabilidad. Para compensar cualquier efecto de retardo del crecimiento provocado por dilución del medio de cultivo por el gran volumen de disolución de orelanina añadido, se complementaron todas las células con volúmenes iguales de tampón de orelanina.

#### Resultados y comentarios

Ninguno de los tipos celulares sometidos a prueba presentó ningún efecto sobre la viabilidad cuando se expusieron a orelanina según el ejemplo 4 en concentraciones de hasta 1.000 µg/ml que fue la concentración alcanzable más alta.

#### Ejemplo 7: La orelanina induce la detención del crecimiento parando el ciclo celular.

##### Antecedentes y metodología

Se trataron células de cáncer renal, cultivadas esencialmente tal como se describe en el ejemplo 3, con orelanina (medio de cultivo 100 µg/ml) durante 24 h. Durante este periodo se recogieron las células tras 0, 2, 6 y 24 h de exposición. Se realizaron inmunotransferencias de tipo Western en el material recogido con anticuerpos dirigidos contra A) el inhibidor de cinasa p21, B) proteína del retinoblastoma fosforilada (un factor estimulante del crecimiento), y C) la proteína cdc2 que permite que la célula avance a la fase M del ciclo celular cuando la célula se divide.

#### Resultados y comentarios

Se muestran los efectos de la exposición a orelanina sobre la expresión de proteína de p21, la proteína del retinoblastoma y cdc2 en la figura 5. Los niveles intracelulares del inhibidor del ciclo celular p21 aumentan con un máximo a alrededor de las 6 h, mientras que las formas fosforiladas estimulantes del ciclo celular de la proteína del retinoblastoma están completamente ausentes en la medición a las 24 h. De un modo similar, la proteína cdc2, que permite que la célula entre en la fase de división celular, está regulada por disminución drásticamente a las 24 h. Esto indica claramente que la orelanina tiene un efecto inhibitor profundo sobre el ciclo celular, que se ejerce en al menos dos puntos de comprobación importantes.

#### Ejemplo 8: La orelanina aumenta la actividad de varias rutas que inducen apoptosis, provocando muerte de células cancerosas.

##### Antecedentes y metodología

Se cultivaron células de cáncer renal y se expusieron a orelanina según el ejemplo 7 y se recogieron en diversos momentos hasta 24 h. El sistema p38 MAPK, el sistema p53, ligando Fas, factor de necrosis tumoral (TNF) alfa y caspasa escindida 3 son factores clave en las rutas apoptóticas que conducen a la muerte celular. Se usó inmunotransferencia de tipo Western para determinar los niveles intracelulares de A) p38, B) caspasa escindida 3, y C) el factor proliferativo fosforilado ERK 1/2. Se usó PCR cuantitativa para determinar la expresión de ARNm de D) modulador de apoptosis regulado por incremento por p53 (PUMA) que media prácticamente en todos los efectos apoptóticos de la ruta de p53, E) ligando Fas y F) TNF.

#### Resultados y comentarios

Se resumen los resultados en las figuras 6 - 8. Se produjo un aumento constante de p38 (activada) fosforilada durante todo el periodo de observación de 24 h, aumentando la intensidad de la señal apoptótica en la célula (figura 6). (La regulación por incremento simultánea de la ERK 1/2 fosforilada del estimulador del crecimiento se interpreta por los inventores como un intento de las células por "superar" la influencia apoptótica de la orelanina.)

A nivel de ARNm, la regulación por incremento extrema de PUMA y los ligandos FasL y TNF de receptor de muerte constituye un fuerte estímulo apoptótico (figura 7). Finalmente, la cantidad de caspasa escindida 3, un efector principal de la apoptosis, aumentó drásticamente 24 h tras la exposición a orelanina (figura 6).

Junto con las imágenes de células cada vez más apoptóticas presentadas en la figura 8, los resultados anteriores indican claramente que la apoptosis es el modo principal de acción de orelanina en células de cáncer renal.

Ejemplo 9: La orelanina erradica carcinomas de células renales humanos que crecen en ratas atímicas.

Antecedentes y metodología

Se usan ratas deficientes en células T, atímicas (RNU, Charles River Laboratories, FRG) como sistema para el crecimiento *in vivo* de carcinomas de células renales humanos. La ausencia de una defensa inmunitaria basada en células T en estos animales los hace tolerantes a xenoinjertos. Una semana tras la llegada a las instalaciones de animales 10 animales reciben una dosis de irradiación X de 5 Gy con el fin de suprimir también su respuesta mediada por células B.

Al día siguiente, se equipan todos los animales con un catéter permanente para diálisis peritoneal (DP). El tratamiento con DP reemplazará la función renal que se pierde como efecto secundario tras la administración de orelanina.

Un día después, se inoculan 5 animales por vía subcutánea en la región del hombro con aproximadamente  $10 \times 10^6$  células de carcinoma renal humano (SKRC-52). Los 5 animales restantes reciben la misma cantidad de células mediante inyección intravenosa. En el grupo subcutáneo pueden palpase tumores localizados,  $1 \times 1 \times 2$  cm, bajo la piel de los animales tras 2-4 semanas. En este punto se les inyecta i.p. a 2 animales (controles) en cada grupo solución salina fisiológica y los 3 animales restantes reciben 10 mg de orelanina/kg de peso corporal i.p.

Resultados y comentarios

Dos semanas tras la primera inyección de solución salina/orelanina, los tumores de los animales control en el grupo subcutáneo tienen aproximadamente el doble de tamaño, mientras que los tumores en los animales a los que se les inyectó orelanina se han reducido hasta menos del 25% de su tamaño registrado en el momento de la inyección. En este punto se inyecta otra dosis de 5 mg de orelanina/kg de peso corporal en el sitio tumoral de los 3 animales en el grupo subcutáneo que ha recibido previamente orelanina, y los animales control reciben 10 mg de orelanina/kg de peso corporal en el sitio tumoral. Tras otras 2 semanas no había signos evidentes de los tumores en los animales a los que se les ha inyectado dos veces orelanina, y el tamaño del tumor en los animales anteriormente control se reduce en más del 75%.

Una y dos semanas tras la primera inyección de solución salina/orelanina, los 5 animales en el grupo intravenoso recibieron inyecciones i.v. de 5 mg/kg de orelanina o solución salina, respectivamente. Otra semana después, los animales se sacrifican y se examinan sus cavidades abdominales y torácicas para observar el crecimiento tumoral. La estimación de la masa tumoral muestra que los animales tratados con orelanina tienen menos del 10% de la carga tumoral de los animales control.

Esto demuestra claramente la actividad de destrucción tumoral de la orelanina en un sistema *in vivo*.

Ejemplo 10: Seguridad de orelanina i.v. durante un tratamiento a largo plazo en cerdos y perros.

Se preparan 5 cerdos de la raza de cerdos enanos Göttingen y 5 perros mestizos (peso corporal 10-15 kg) para hemodiálisis usando un equipo diseñado para niños y lactantes. Los animales reciben dosis iniciales de 10 mg de orelanina/kg de peso corporal 24 h después y los animales se someten a una sesión de diálisis de aproximadamente 3 h. Tras la diálisis, se les inyecta a los animales 5 mg de orelanina/kg de peso corporal. El procedimiento de diálisis/reinyección se repite 3 veces a la semana (lunes, miércoles, viernes) durante 8 semanas. Una vez a la semana se hace una valoración del estado general de los animales. Al final del experimento se sacrifican todos los animales, y se toman especímenes para la evaluación histopatológica de corazón, pulmón, riñón, hígado, bazo, intestino delgado, intestino grueso, cerebro, músculo y piel.

El comportamiento y estado general de los animales permanecen normales durante todo el periodo experimental. El examen histopatológico no revela daño al tejido con la excepción de los riñones en los que hay daño tubular extendido que conduce a insuficiencia renal completa.

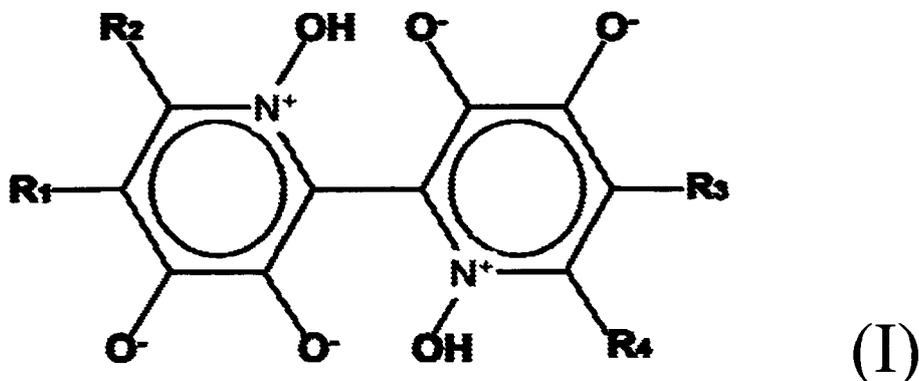
Los resultados muestran que el tratamiento a largo plazo con dosis altas de orelanina es seguro desde el punto de vista del paciente con cáncer renal, con efectos secundarios insignificantes en tejido no renal.

Ejemplo 11: Tratamiento de un paciente humano, que padece carcinoma de células renales avanzado, con orelanina

5 A un paciente que necesita tratamiento para un carcinoma renal se le proporcionan una serie de 10 inyecciones intravenosas diarias de orelanina. Se determina que la carga tumoral inicial del paciente es de aproximadamente 2 kg. Basándose en este valor, se determina que la dosis diaria apropiada es de 280 mg (4 mg/kg a un peso corporal de 70 kg). Antes de la primera inyección, se prepara al paciente para la hemodiálisis o diálisis peritoneal ya que el tratamiento con orelanina destruirá de manera inevitable el tejido epitelial renal sano junto con la destrucción de las células cancerosas, dejando por tanto el paciente sin función renal. Dos horas tras cada inyección, se inicia la hemodiálisis y se mantiene durante 2 horas. Este procedimiento, con administración repetida de cantidades menores de orelanina, tiene el beneficio de realizar una acumulación gradual de orelanina hasta niveles letales en el tejido tumoral, que capta activamente la sustancia, mientras que las concentraciones extracelulares de la toxina se mantienen por debajo de los niveles que podrían provocar efectos secundarios. Opcionalmente, si la enfermedad es unilateral, el riñón no afectado puede extirparse quirúrgicamente y conservarse durante el tratamiento, e intentarse su reimplante tras 10 la conclusión del tratamiento. La evolución del paciente se monitoriza durante un mes, tras lo cual se proporcionan administraciones en serie adicionales de orelanina según sea necesario para inhibir el crecimiento del carcinoma renal. Durante el tratamiento, la masa del tejido tumoral en el paciente disminuye, y a la conclusión del tratamiento el cáncer renal está completamente erradicado, demostrando la eficacia de la orelanina contra el carcinoma de células claras renales. 15

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto según la fórmula (I):



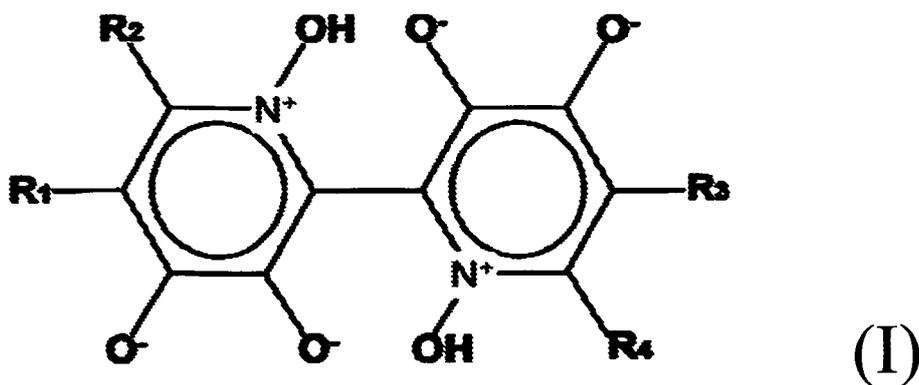
- 5 en la que

$R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y/o  $R_4$  se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo, alquilo  $C_1-C_6$ , alquenilo  $C_1-C_6$ , alquinilo  $C_1-C_6$ , alcohol  $C_1-C_6$ , alquenol  $C_1-C_6$ , alcoxilo  $C_1-C_6$ , alquenoxilo  $C_1-C_6$ ,

15 cada uno de los cuales de alquilo  $C_1-C_6$ , alquenilo  $C_1-C_6$ , alquinilo  $C_1-C_6$ , alcohol  $C_1-C_6$ , alquenol  $C_1-C_6$ , alcoxilo  $C_1-C_6$ , alquenoxilo  $C_1-C_6$  puede estar sustituido adicionalmente con restos seleccionados del grupo que consiste en amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo, o la cantidad molar equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento.

2. Compuesto según la reivindicación 1, para su uso como medicamento, en el que  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son hidrógeno.

- 20 3. Compuesto según la fórmula (I):



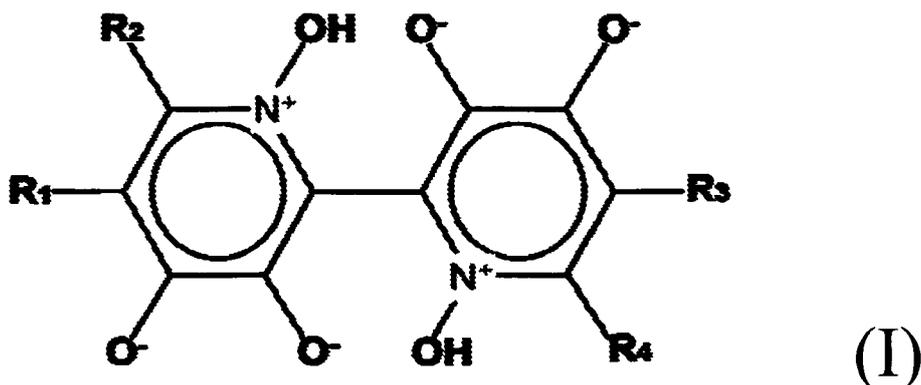
- 25 en la que

$R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y/o  $R_4$  se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo, alquilo  $C_1-C_6$ , alquenilo  $C_1-C_6$ , alquinilo  $C_1-C_6$ , alcohol  $C_1-C_6$ , alquenol  $C_1-C_6$ , alcoxilo  $C_1-C_6$ , alquenoxilo  $C_1-C_6$ ,

30 cada uno de los cuales de alquilo  $C_1-C_6$ , alquenilo  $C_1-C_6$ , alquinilo  $C_1-C_6$ , alcohol  $C_1-C_6$ , alquenol  $C_1-C_6$ , alcoxilo  $C_1-C_6$ , alquenoxilo  $C_1-C_6$  puede estar sustituido adicionalmente con restos seleccionados del grupo

que consiste en amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo, o la cantidad molar equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de carcinoma de células renales.

- 5 4. Compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son hidrógeno.
5. Compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el tratamiento de carcinoma de células renales incluye la administración del compuesto como una dosis única de 1 mg/kg a 100 mg/kg.
- 10 6. Compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el tratamiento de carcinoma de células renales incluye la administración del compuesto en dos o más dosis, comprendiendo cada dosis entre 1 mg/kg y 20 mg/kg del compuesto.
7. Compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el tratamiento de carcinoma de células renales incluye la administración del compuesto en dosis secuenciales separadas entre dos y siete días.
- 15 8. Compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el tratamiento de carcinoma de células renales incluye administración diaria del compuesto.
- 20 9. Composición farmacéutica que comprende al menos un portador farmacéuticamente aceptable y de 50 mg a 3.500 mg de un compuesto según la fórmula (I):

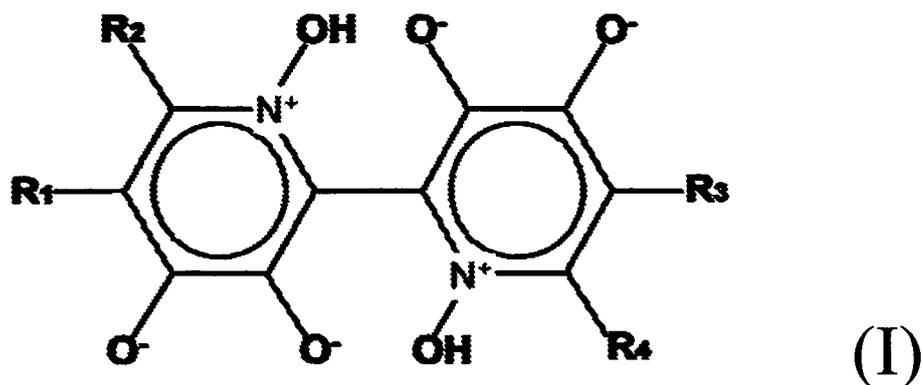


25 en la que

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y/o R<sub>4</sub> se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenoilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,

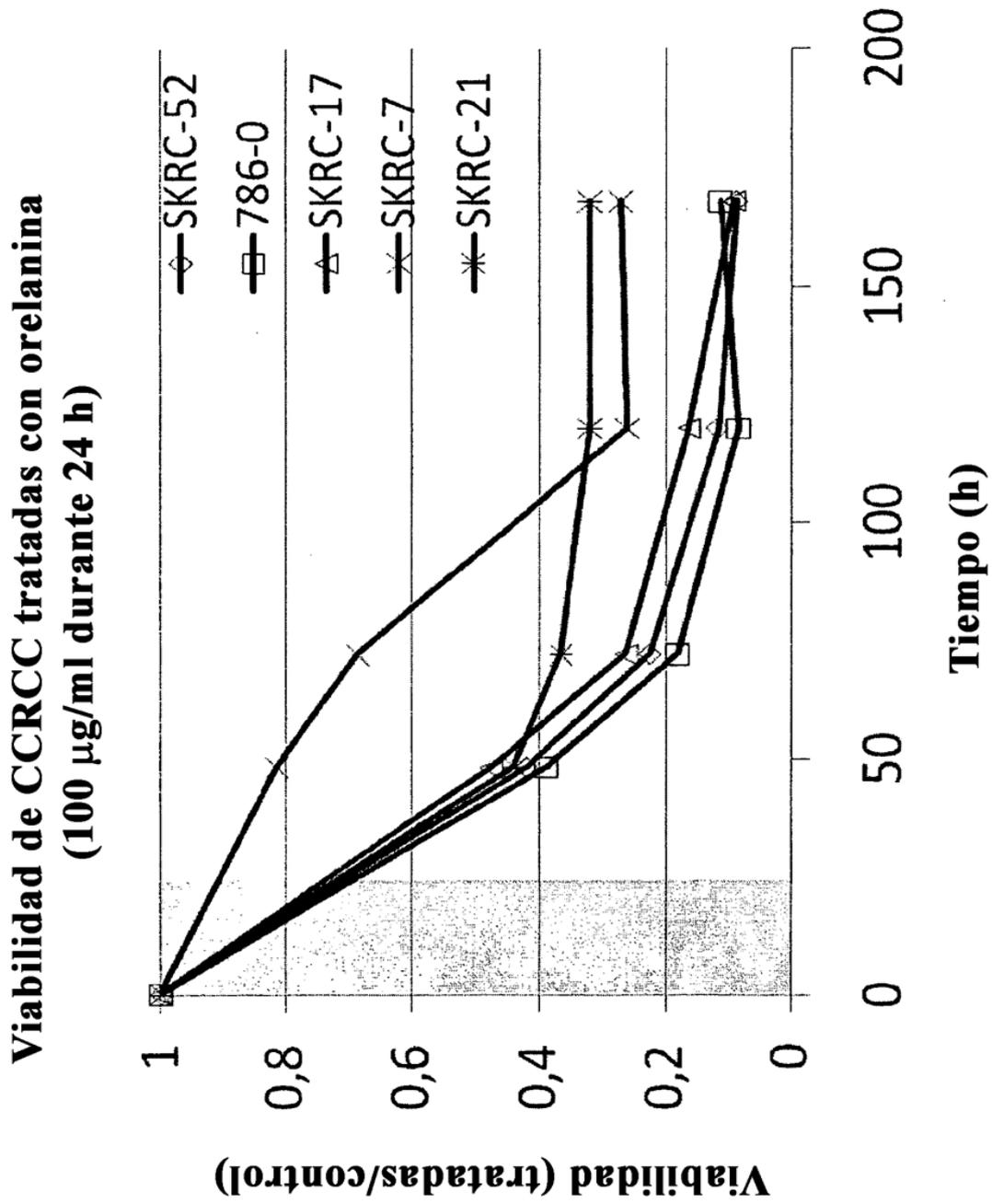
30 cada uno de los cuales de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenoilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> puede estar sustituido adicionalmente con restos seleccionados del grupo que consiste en amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo, o la cantidad molar equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 35 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son hidrógeno.
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 9 ó 10, en la que el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable.
- 40 12. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en la que la composición se formula para la administración intravenosa, subcutánea o intraperitoneal a un paciente.
- 45 13. Kit para su uso para tratar un paciente que padece o es susceptible de carcinoma de células renales, que comprende al menos un portador farmacéuticamente aceptable y de 50 mg a 3.500 mg de un compuesto según la fórmula I:



en la que

- 5 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y/o R<sub>4</sub> se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,
- 10 cada uno de los cuales de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, puede estar sustituido adicionalmente con restos seleccionados del grupo que consiste en amino, mercapto, carboxilo, fosfato y halo, incluyendo flúor, cloro y bromo, o la cantidad molar equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
14. Kit para su uso según la reivindicación 13, en el que el compuesto según la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el portador farmacéuticamente aceptable se combinan, en relación con la administración, de tal manera que el compuesto según la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se disuelve completa o sustancialmente en el portador.
15. Kit para su uso según la reivindicación 13 ó 14, en el que el compuesto se formula para la administración intravenosa, subcutánea o intraperitoneal a un paciente.
- 20



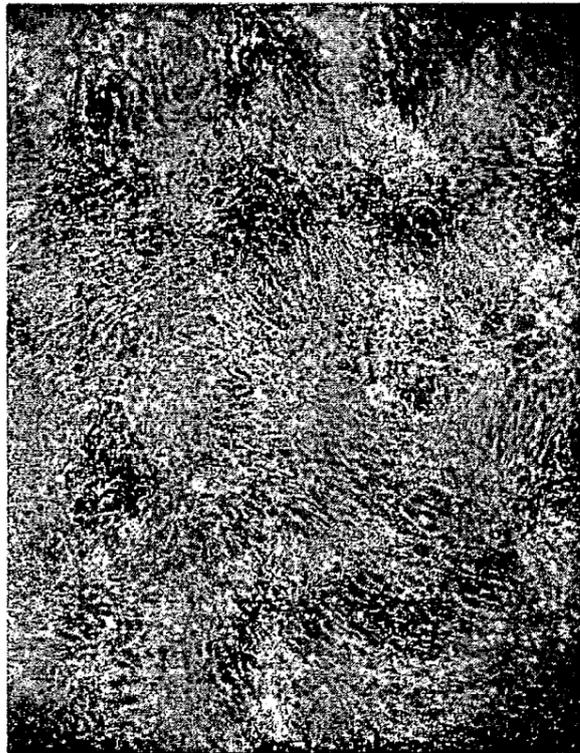
**Figura 1**

**Células 786-0 tras una semana de incubación con orelanina**

**Tratadas con orelanina  
(24 h, 100 µg/ml)**



**Células control**



**Figura 2**

Respuesta 96 h tras una incubación de 24 h con orelanina  
 en las líneas de CCRCC 786-0 y SKRC7

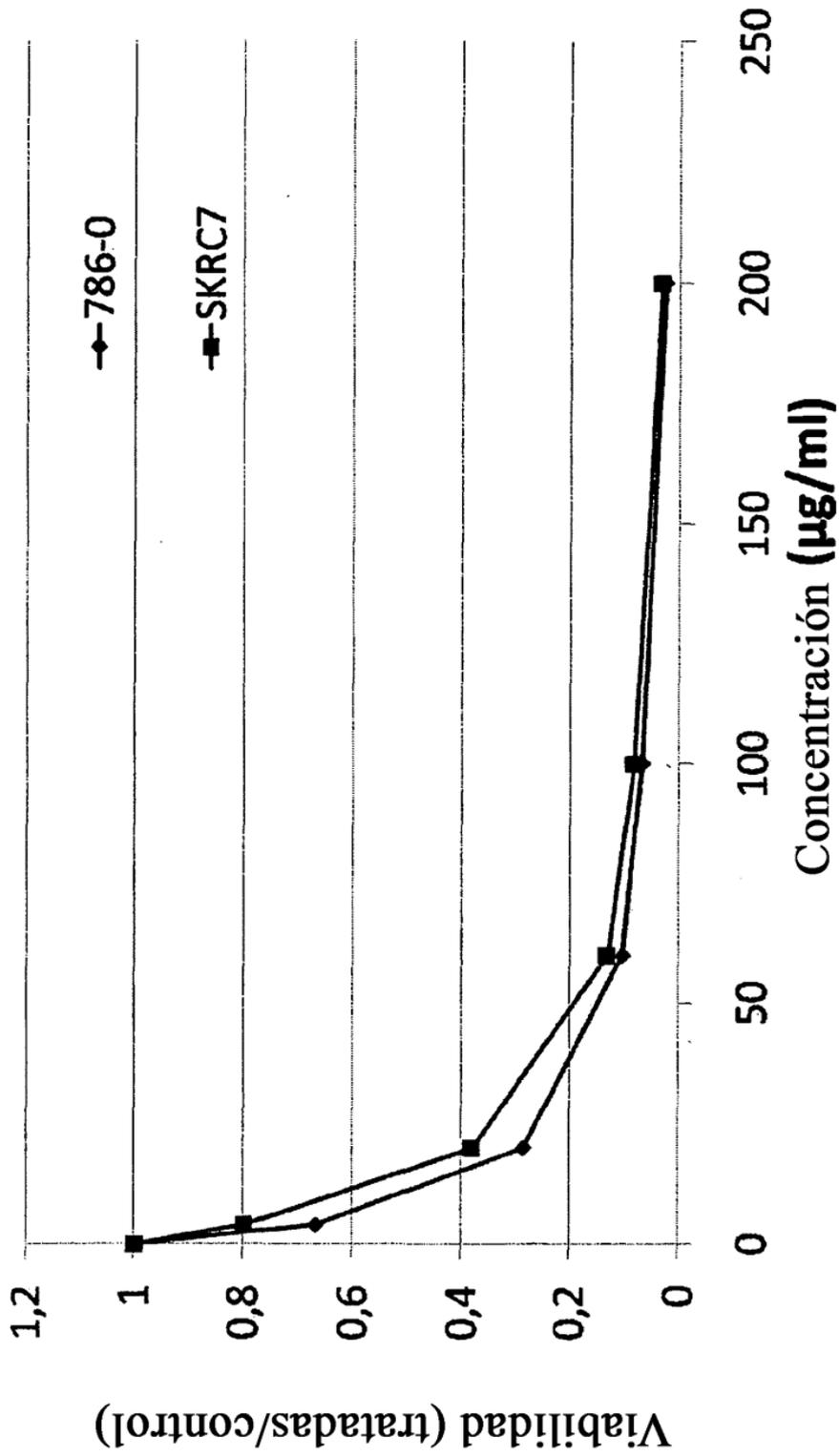


Figura 3

Viabilidad de CCRCC tras 2 dosis repetidas de  
20  $\mu\text{m}/\text{ml}$  de orelanina (n = 3)

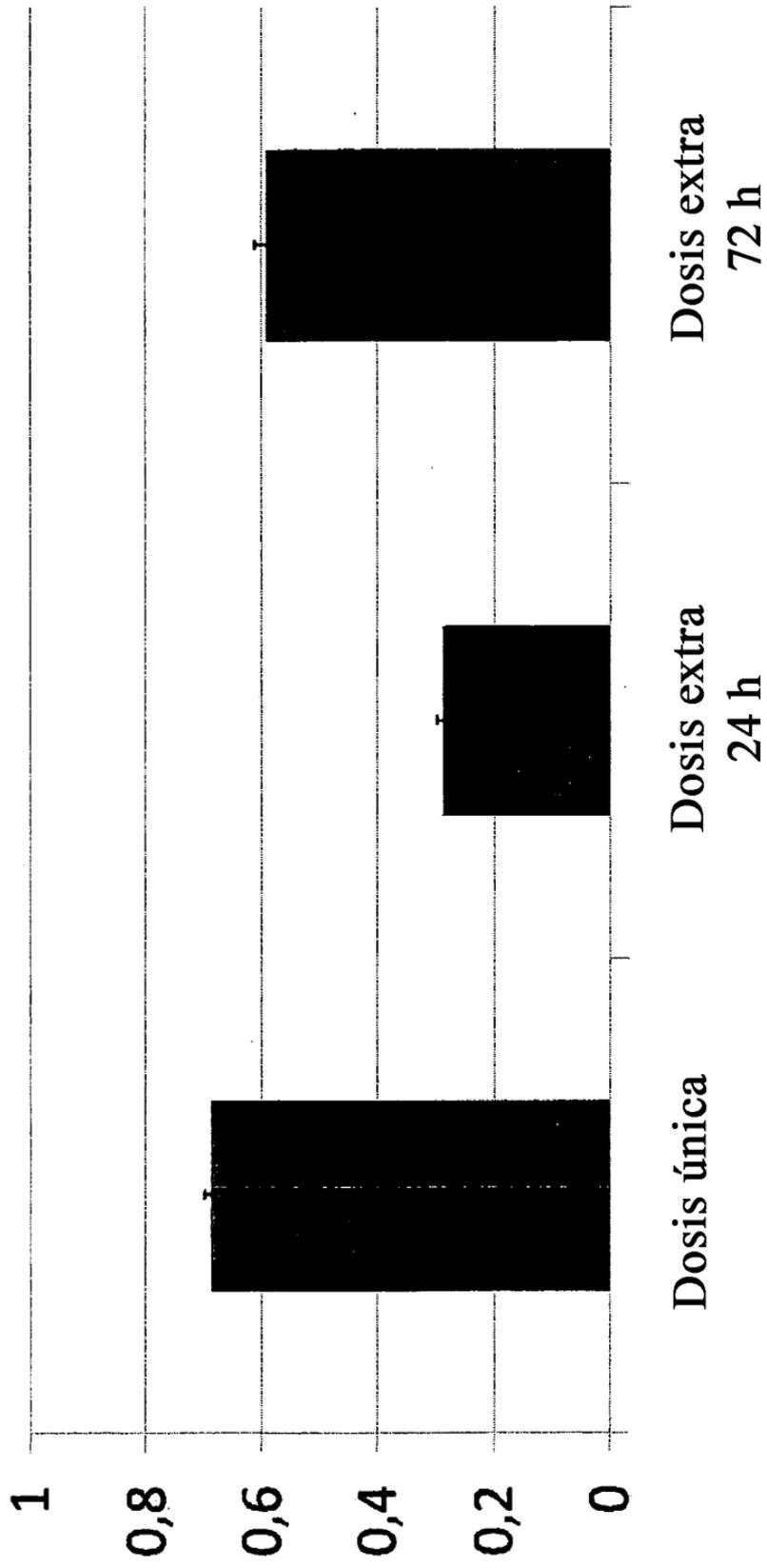


Figura 4

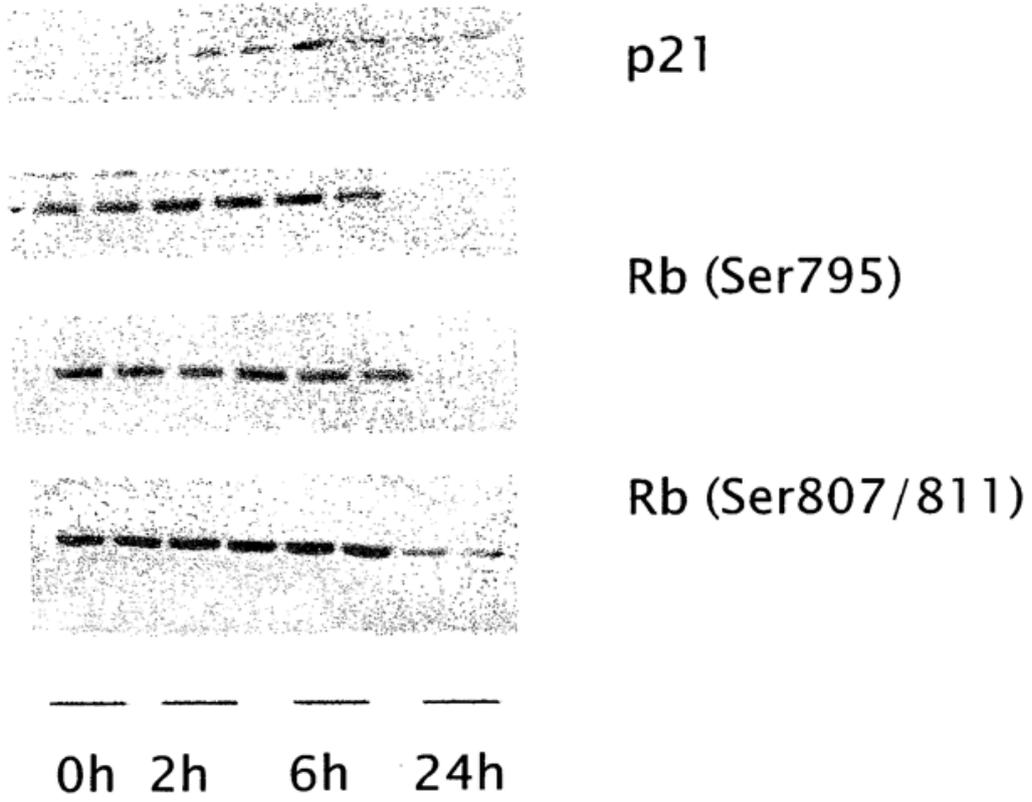


Figura 5

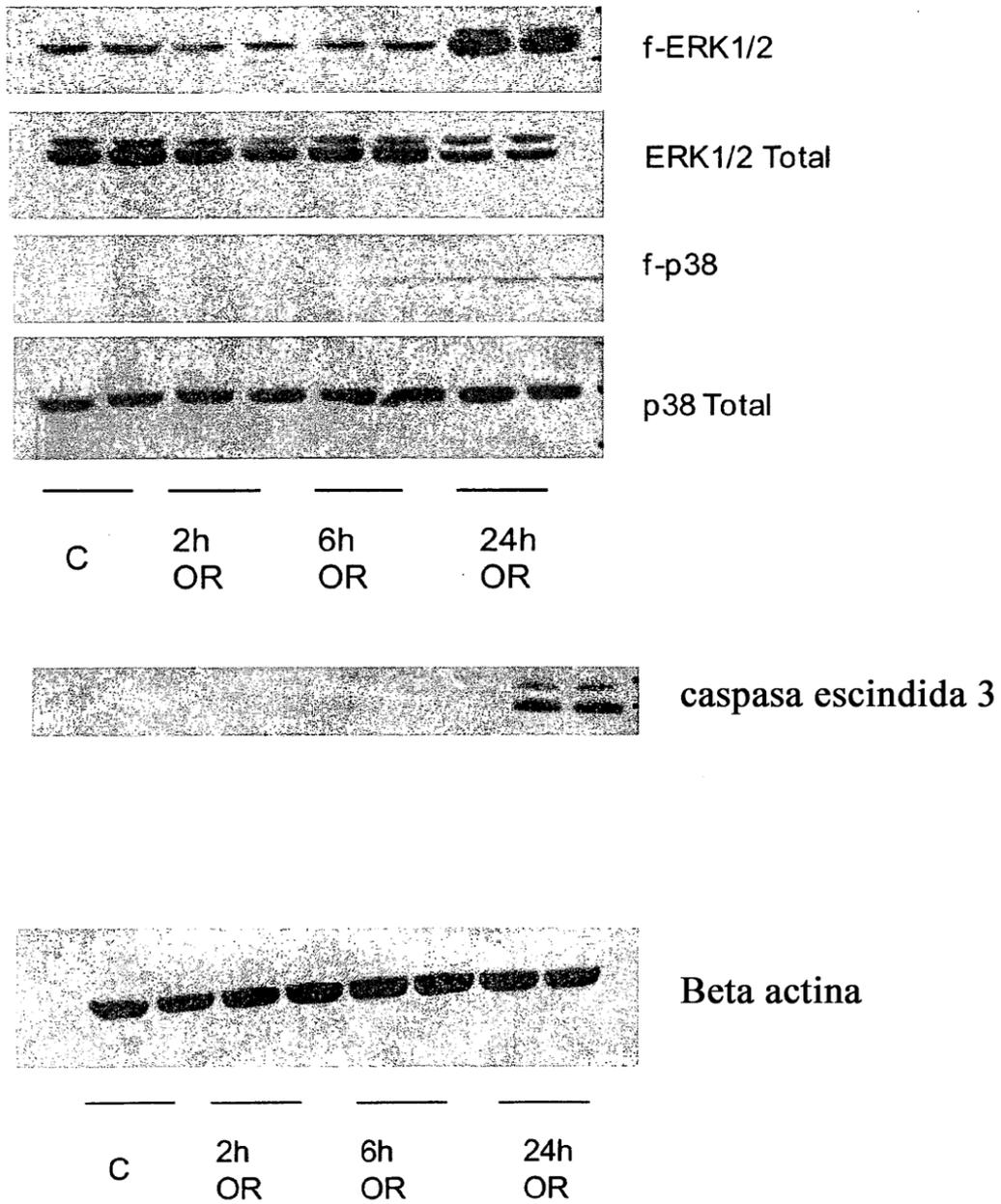


Figura 6

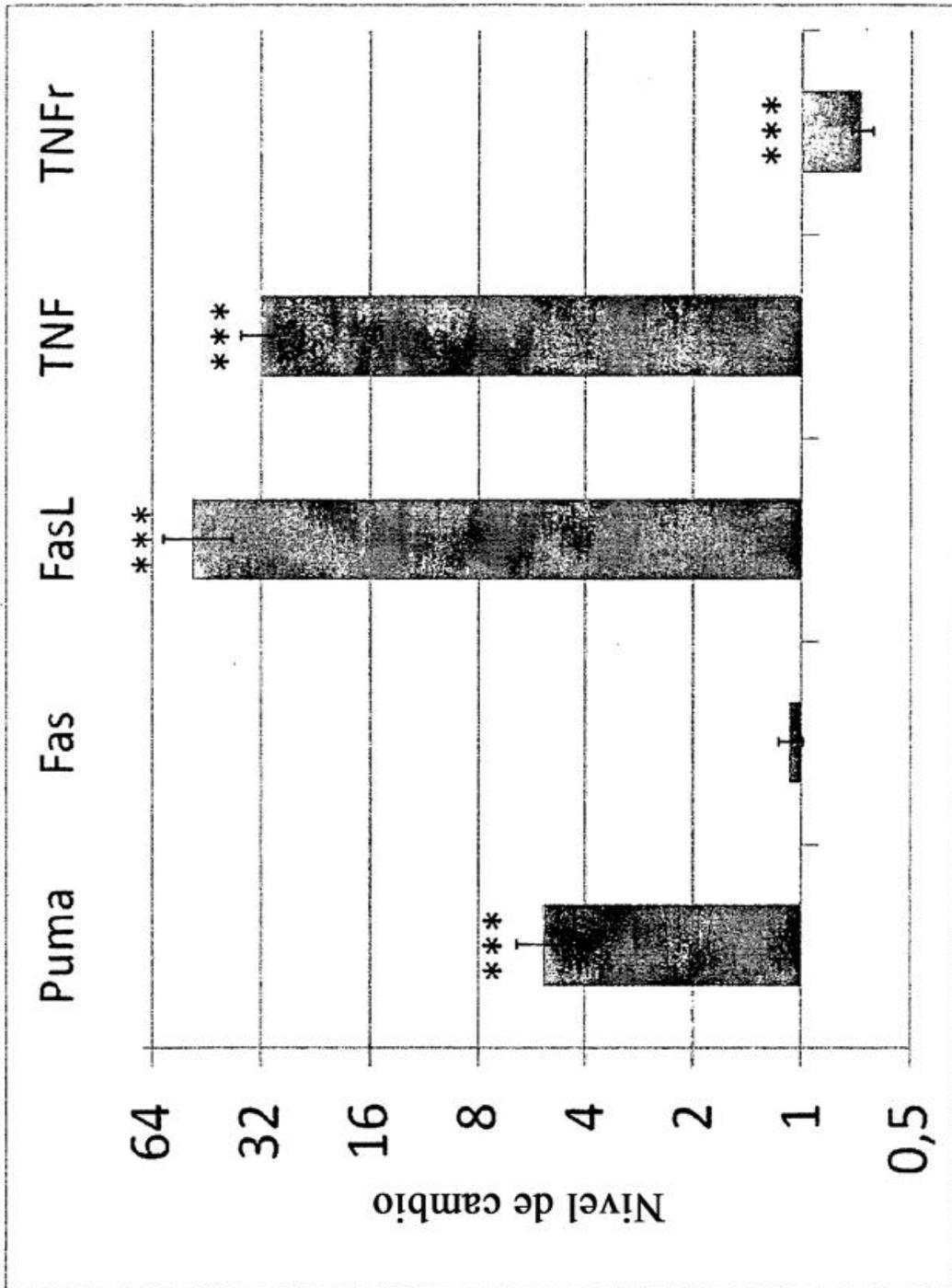
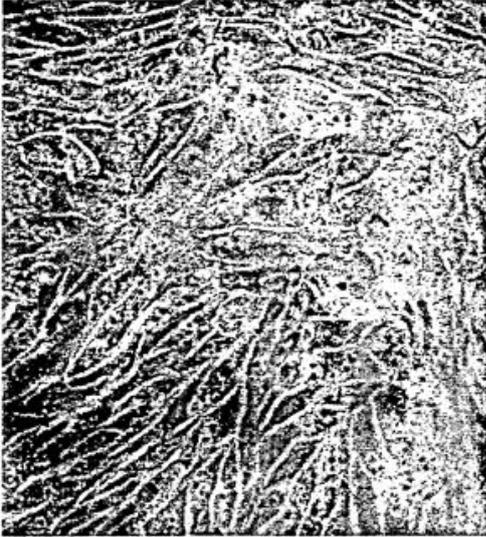
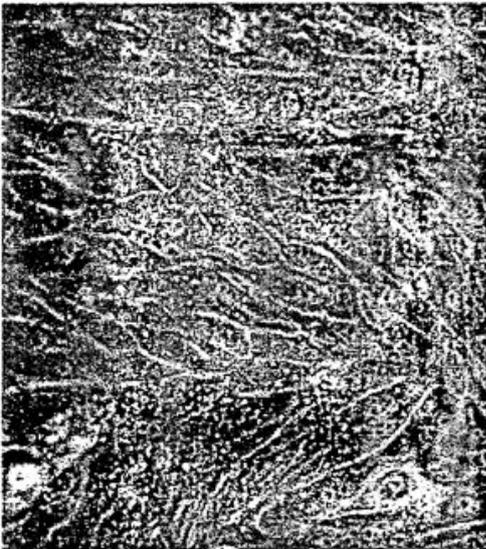


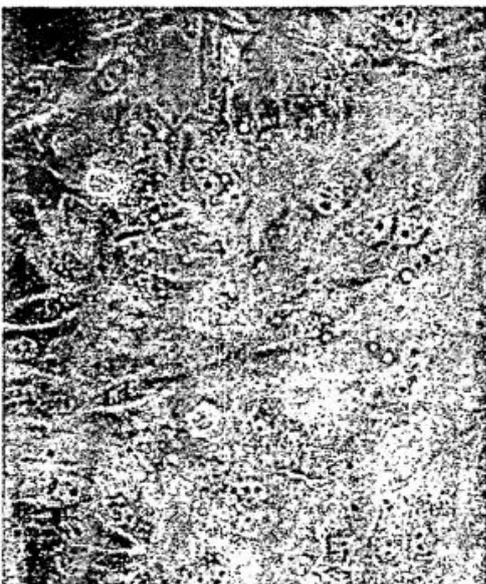
Figura 7



**Células control**



**Incubación con OR 4 h**



**Incubación con OR 24 h**

**Figura 8**