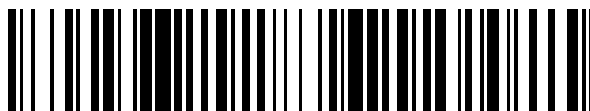


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 686**

51 Int. Cl.:

**C07D 239/90** (2006.01)  
**C07D 405/12** (2006.01)  
**C07D 409/12** (2006.01)  
**A61K 31/495** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2006 E 06733907 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 1848698**

54 Título: **Derivados de quinoxalina como agentes antitumorales**

30 Prioridad:

**25.01.2005 US 647303 P**  
**24.01.2006 US 762221 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.06.2013**

73 Titular/es:

**PROLEXYS PHARMACEUTICALS, INC. (33.3%)**  
**2150 West Dauntless Ave.**  
**Salt Lake City, UT 84116, US;**  
**WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL**  
**RESEARCH (33.3%) y**  
**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN**  
**THE CITY OF NEW YORK (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BECKLIN, ROBERT R.;**  
**CHEPANOSKE, CINDY LOU;**  
**PELTER, JOHN M.;**  
**QI, LONGWU;**  
**ROBBINS, PAUL B.;**  
**SAHASRABUDHE, SUDHIR R.;**  
**SELLIAH, ROBERT;**  
**SIMMONS, KEITH;**  
**STOCKWELL, BRENT R.;**  
**VENKAT, RAJ, GOPAL;**  
**VON RECHENBERG, MORITZ y**  
**ZHEN, EUGENE**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

**ES 2 409 686 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

Derivados de quinoxalina como agentes antitumorales

5 **Antecedentes de la invención**

Muchos fármacos administrados para el tratamiento de una enfermedad se dirigen contra las diferencias generales entre una célula enferma y una célula normal. Por ejemplo, el paclitaxel, que se usa para tratar el cáncer de ovario y de mama e inhibe la función de los microtúbulos, se cree que presenta una especificidad hacia las células tumorales basada en la mayor tasa de proliferación de las células tumorales con respecto a las células normales (Miller y Ojima, *Chem. Rec.* 1:195-211, 2002). Sin embargo, a pesar de esta opinión consensuada, la actividad *in vitro* del paclitaxel varía ampliamente entre las líneas de células tumorales (Weinstein *et al.*, *Science* 275:343-349, 1997), lo que indica que los factores genéticos pueden modificar la sensibilidad de las células tumorales hacia el paclitaxel y que la capacidad de respuesta de las células tumorales no está simplemente determinada por su tasa de proliferación.

Los agentes terapéuticos dirigidos molecularmente representan un nuevo y prometedor enfoque de descubrimiento de fármacos anticancerígenos (Shawver *et al.*, *Cancer Cell* 1: 117-23, 2002). Con el uso de este enfoque, se diseñan moléculas pequeñas para inhibir directamente las proteínas muy oncogénicas que están mutadas o sobreexpresadas en determinados tipos de células tumorales. Al dirigirse a determinados defectos moleculares que se encuentran en las células tumorales, en última instancia, este enfoque puede proporcionar terapias a la medida de la composición genética de cada tumor. Dos ejemplos recientes de agentes terapéuticos anticancerígenos dirigidos molecularmente con éxito son Gleevec (mesilato de imatinib), un inhibidor de la oncoproteína de quinasa Abelson de la región de fractura (BCR-ABL) descubierta en la leucemia mieloide crónica positiva en el cromosoma Filadelfia (Capdeville *et al.*, *Nat Rev Drug Disco* 1: 493-502, 2002) y la Herceptina (trastuzumab), un anticuerpo monoclonal dirigido contra la oncoproteína HER2/NEU que se encuentra en los cánceres de mama metastásicos (Mokbel y Hassanally, *Curr Med Res Opin* 17: 51-9, 2001).

Una estrategia complementaria implica la búsqueda de agentes antitumorales selectivos del genotipo que se convierten en letales para las células tumorales solo en presencia de oncoproteínas específicas o en ausencia de determinados supresores tumorales. Tales compuestos selectivos del genotipo se podrían dirigir directamente hacia oncoproteínas o se podrían dirigir hacia otras proteínas de importancia fundamental implicadas en las redes de señalización ligadas a oncoproteínas. Los compuestos sobre los que se ha publicado que muestran una letalidad sintética incluyen (i) el análogo de rapamicina CCI-779 en las células de mieloma que carecen de PTEN (Shi *et al.*, *Cancer Res.* 62: 5027-34, 2002), (ii) Gleevec en las células transformadas en BCR-ABL ((Druker *et al.*, *Nat Med* 2: 561-6, 1996) y (iii) una variedad de compuestos no tan bien caracterizados (Stockwell *et al.*, *Chem Biol* 6: 71-83, 1999; Torrance *et al.*, *Nat Biotechnol* 19: 940-5, 2001). En *Cancer Cell*, vol. 3, 2003, p. 285-296, S. Dolma *et al.* tratan la "identificación de agentes antitumorales selectivos del genotipo mediante el uso del rastreo químico letal sintético en células tumorales humanas manipuladas genéticamente". El documento US 2004/0248221 también se refiere a la identificación de agentes antitumorales selectivos del genotipo.

A pesar de la investigación descrita anteriormente, sigue habiendo una necesidad significativa de desarrollar y/o identificar compuestos que se dirijan selectivamente a células tumorales.

45 **Resumen de la invención**

Con el uso de un método de rastreo letal sintético, particularmente, un método de rastreo letal sintético de alto rendimiento que sea útil en la identificación de agentes o fármacos para tratar o prevenir afecciones o enfermedades tales como la presencia o el desarrollo de tumores u otras afecciones caracterizadas por una hiperproliferación celular (por ejemplo, leucemia), los solicitantes han identificado una serie de compuestos/agentes/fármacos útiles para tratar o prevenir el cáncer (por ejemplo, tumores o leucemia) en un individuo, tal como un ser humano, en necesidad de tratamiento o prevención. La invención también proporciona proteínas celulares que se unen directa o indirectamente a determinados compuestos/agentes identificados de valor terapéutico. Tales proteínas celulares proporcionan métodos adicionales para tratar enfermedades o afecciones caracterizadas por una hiperproliferación celular (por ejemplo, leucemia).

Como se usan en la presente memoria, los términos "agente" y "fármaco" se usan indistintamente, pudiendo ser compuestos o moléculas.

60 En una realización, la presente invención se dirige a un compuesto según lo definido en las reivindicaciones, incluyendo sales del mismo.

En otra realización, la presente invención se dirige al uso de un compuesto según lo definido en las reivindicaciones para la preparación de una composición farmacéutica.

65

También se describen métodos de rastreo para la identificación de compuestos que destruyan o inhiban el crecimiento de células tumorales tales como células tumorigénicas manipuladas genéticamente, pero no sus células homólogas normales isogénicas. El método se ha usado para identificar compuestos conocidos y nuevos con actividad selectiva del genotipo, incluyendo compuestos conocidos como doxorubicina, daunorrubicina, mitoxantrona, camptotecina sangivamicina, equinomicina, buvardina, NSC146109 y un compuesto denominado en la presente memoria erastina. En general, estos compuestos han aumentado la actividad en presencia de uno o más de los siguientes: oncoproteína hTERT, oncoproteína T grande de SV40 (LT), oncoproteína T pequeña (ST), oncoproteína E6 del virus del papiloma humano de tipo 16 (VPH), oncoproteína E7 del VPH, y HRAS, NRAS y KRAS oncogénicas. Los solicitantes determinaron que la sobreexpresión de hTERT y bien de E7 o de LT aumentó la expresión de la topoisomerasa 2a, y que la sobreexpresión de RAS<sup>V12</sup> y ST en células que expresan hTERT aumentó tanto la expresión de la topoisomerasa 1 como de células sensibilizadas a un proceso de muerte celular no apoptótica iniciado por la erastina.

Se describe un método para la identificación de agentes (por ejemplo, fármacos) que sean selectivamente tóxicos para (por ejemplo, que maten o inhiban el crecimiento de) células tumorigénicas tales como células tumorigénicas manipuladas genéticamente, incluyendo células tumorigénicas humanas (por ejemplo, células tumorigénicas y/o células tumorales humanas manipuladas genéticamente). Una realización se refiere a un método para identificar un agente (por ejemplo, fármaco) que mate o inhiba selectivamente el crecimiento de (sea tóxico para) células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente que comprende poner en contacto células de ensayo, que son células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente, con un agente candidato; determinar la viabilidad de las células de ensayo en contacto con el agente candidato; y comparar la viabilidad de las células de ensayo con la viabilidad de un control apropiado. En todas las realizaciones, la viabilidad se evalúa mediante la determinación de la capacidad de un agente (por ejemplo, fármaco) para matar células o inhibir el crecimiento/la proliferación de las células, o ambas cosas. Si la viabilidad de las células de ensayo es inferior a la de las células de control, entonces se identifica un agente (por ejemplo, fármaco) que es selectivamente tóxico para (mata o inhibe el crecimiento de) células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente. Un control adecuado es una célula que es del mismo tipo de célula que la célula de ensayo, a excepción de que la célula de control no está manipulada genéticamente para ser tumorigénica. Por ejemplo, las células de control pueden ser las células primarias parentales de las que derivan las células de ensayo. Las células de control se ponen en contacto con el agente candidato en las mismas condiciones que las células de ensayo. Un control apropiado se puede procesar de forma simultánea, o puede estar preestablecido (por ejemplo, una referencia o un patrón preestablecido).

En una realización, el método de identificación de un agente selectivamente tóxico para las células tumorigénicas comprende evaluar además la toxicidad de un agente identificado como resultado del rastreo de células humanas tumorigénicas manipuladas genéticamente en un modelo animal apropiado, o en un sistema o ensayo basado en células o no basado en células adicional. Por ejemplo, se puede evaluar la toxicidad de un agente o fármaco así identificado para células cancerosas tales como células tumorales o células leucémicas obtenidas de individuos o su toxicidad para una o más líneas celulares (tumorales) de cáncer. Por ejemplo, el método puede comprender además la evaluación de la toxicidad selectiva de un agente (por ejemplo, un fármaco) para las células tumorigénicas en un modelo murino apropiado o un primate no humano. La invención se refiere además a un método para producir un agente (por ejemplo, un fármaco) que es identificado mediante el método de la presente invención, tal como un agente (por ejemplo, un fármaco) que es selectivamente tóxico para células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente. Un agente (por ejemplo, un fármaco) que ha demostrado ser selectivamente tóxico para las células tumorales se sintetiza usando métodos conocidos.

Se describe además un método para la identificación de agentes (por ejemplo, fármacos) que sean tóxicos para células tumorigénicas manipuladas genéticamente tales como células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente. En una realización, la invención se refiere a un método para identificar un agente (por ejemplo, un fármaco) que mate o inhiba el crecimiento de (sea tóxico para) células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente, que comprende poner en contacto células de ensayo, que son células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente, con un agente candidato; determinar la viabilidad de las células de ensayo en contacto con el agente candidato; y comparar la viabilidad de las células de ensayo con la viabilidad de un control apropiado. Si la viabilidad de las células de ensayo es inferior a la de las células de control, entonces se identifica un agente (por ejemplo, un fármaco) que es tóxico para (mata o inhibe el crecimiento de) células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente. En este caso, un control apropiado es una célula que es del mismo tipo de célula (por ejemplo, células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente) que las células de ensayo, a excepción de que la célula de control no se pone en contacto con el agente candidato. Un control apropiado se puede procesar de forma simultánea, o puede estar preestablecido (por ejemplo, una referencia o un patrón preestablecido). Por ejemplo, se puede evaluar la toxicidad de un agente o fármaco así identificado para células cancerosas tales como células tumorales o células leucémicas obtenidas de individuos o su toxicidad para una o más líneas celulares (tumorales) de cáncer.

En una realización, el método de identificación de un agente tóxico para las células tumorigénicas manipuladas genéticamente comprende además evaluar la toxicidad de un agente identificado como resultado del rastreo de células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente en un modelo animal apropiado, o en un sistema o ensayo basado en células o no basado en células adicional. Por ejemplo, el método puede comprender además

evaluar la toxicidad de un agente (por ejemplo, un fármaco) para células tumorigénicas en un modelo murino apropiado o un primate no humano. También se describe un método para producir un agente (por ejemplo, un fármaco) que es identificado mediante un método descrito en la presente memoria tal como un agente (por ejemplo, un fármaco) que es tóxico para células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente. Un agente (por ejemplo, un fármaco) que ha demostrado ser tóxico para células tumorigénicas se sintetiza mediante métodos conocidos.

También se describe un método para reducir la tasa de crecimiento de un tumor, que comprende administrar una cantidad de un agente terapéutico suficiente para reducir la tasa de crecimiento del tumor, en el que el agente terapéutico es:

- (a) un agente que aumenta o inhibe el nivel de una proteína VDAC;
- (b) un agente que aumenta o inhibe la actividad de una proteína VDAC;
- (c) un agente que se une a una proteína VDAC;
- (d) un agente que se une y/o modula un complejo proteico que comprende al menos una proteína VDAC y, opcionalmente, una o más de otras proteínas;
- (e) un agente que comprende un polipéptido VDAC o variantes funcionales del mismo; o
- (f) un agente que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido VDAC o variantes funcionales del mismo.

Los agentes adecuados pueden tener la actividad citada en la forma existente, o tras el metabolismo completo o parcial.

Un aspecto es un método para tratar un paciente que padece un cáncer, que comprende administrar al paciente un agente terapéutico seleccionado entre:

- (a) un agente que aumenta o inhibe el nivel de una proteína VDAC;
- (b) un agente que aumenta o inhibe la actividad de una proteína VDAC;
- (c) un agente que se une a una proteína VDAC;
- (d) un agente que se une y/o modula un complejo proteico que comprende al menos una proteína VDAC y, opcionalmente, una o más de otras proteínas;
- (e) un agente que comprende un polipéptido VDAC o variantes funcionales del mismo; y
- (f) un agente que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido VDAC o variantes funcionales del mismo.

Los agentes adecuados pueden tener la actividad citada en la forma existente, o tras el metabolismo completo o parcial.

Los agentes adecuados para su uso en la reducción de la tasa de crecimiento de un tumor y en el tratamiento de un paciente que padece cáncer incluyen, pero sin limitación, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, proteínas, peptidomiméticos, ácidos nucleicos, anticuerpos y combinaciones de los mismos. Tales agentes se formulan típicamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y se pueden administrar por vía intravenosa, oral, bucal, parenteral, mediante pulverizado de inhalación, por vía tópica o transdérmica. El agente también se puede administrar mediante administración local. Además, el agente se pueden administrar junto con al menos un agente quimioterapéutico adicional contra el cáncer que inhiba las células cancerosas de manera aditiva o sinérgica.

Se divulga además un método para aumentar la sensibilidad de una célula tumoral a un agente quimioterapéutico, en el que se pone en contacto una célula tumoral con un compuesto que aumenta o disminuye la abundancia de una proteína de unión a erastina. Un aspecto relacionado es un método para reducir la sensibilidad de una célula normal a un agente quimioterapéutico, en el que se pone en contacto una célula normal con un compuesto que aumenta o disminuye la abundancia de una proteína de unión a erastina.

En ciertas realizaciones, se identifica un agente candidato mediante rastreo de un biblioteca de compuestos anotados, una biblioteca combinatoria u otra biblioteca que comprende compuestos desconocidos o conocidos (por ejemplo, agentes, fármacos) o ambos.

También se describe un método para identificar un agente terapéutico candidato para inhibir la proliferación celular no deseada, que incluye:

- a) mezclar un agente de ensayo y una proteína VDAC o un complejo proteico que comprende al menos una proteína VDAC y, opcionalmente, una o más proteínas distintas;
- b) determinar si el agente de ensayo se une a la proteína VDAC; y
- c) si el agente de ensayo se une a la proteína VDAC, poner en contacto el agente de ensayo con una célula (*in vivo* o *in vitro*) y determinar si el agente de ensayo altera la proliferación de la célula.

La unión de la proteína VDAC con el agente de ensayo se puede detectar, por ejemplo, mediante un ensayo de unión física, tal como un ensayo de inmunounión, ensayo de dos híbridos de levadura, ensayo de polarización de la fluorescencia, ensayo de resonancia de plasmones superficiales o de transferencia de la energía de resonancia de fluorescencia (FRET).

5 En ciertas realizaciones, la invención se refiere a una clase de compuestos relacionados con la erastina (por ejemplo, los compuestos de la presente invención).

10 La invención se refiere a análogos de erastina que matan o inhiben selectivamente el crecimiento de (son tóxicos a) células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente. Opcionalmente, estos compuestos de la invención se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable en forma de composiciones farmacéuticas.

15 También se describen métodos para identificar componentes celulares implicados en la tumorigénesis. Los componentes celulares incluyen, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, enzimas, receptores), ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN) y lípidos (por ejemplo, fosfolípidos). Una realización se refiere a un método de identificación de uno o más componentes celulares implicados en la tumorigénesis, en el que (a) una célula, tal como una célula tumorigénica humana manipulada genéticamente, se pone en contacto con erastina; y (b) se identifica un componente celular que interactúa con la erastina, bien directa o indirectamente. El componente celular que se identifica es un componente celular implicado en la tumorigénesis. Una realización adicional se refiere a un método de identificación de uno o más componentes celulares que interactúan con la erastina, en el que (a) una célula, tal como una célula, un tejido, un órgano, un organismo o un lisado tumorigénico humano manipulado genéticamente, o un extracto de uno de los anteriores, se pone en contacto con erastina; y (b) se identifica un componente celular que interactúa con la erastina, bien directa o indirectamente. El componente celular que se identifica es un componente celular que interactúa con la erastina, bien directa o indirectamente.

25 También se describen métodos para tratar o prevenir el cáncer, por ejemplo, un método para tratar o prevenir el cáncer en el que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto tal como, por ejemplo, erastina o su análogo, o un compuesto de las fórmulas I-V que se presentan a continuación, a un individuo en necesidad de un tratamiento del cáncer. En ciertas realizaciones, el cáncer se caracteriza por células en las que la vía de RAS está activada. En ciertas realizaciones adicionales, el cáncer se caracteriza por células que expresan la oncoproteína T pequeña de SV40, o son fenotípicamente similares a células que expresan ST y/o HRAS oncogénica. En ciertas realizaciones preferidas, las células expresan el nivel de tipo sustancialmente natural de Rb (por ejemplo, al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130% o 150%, etc.).

35 Además, se describen métodos para la identificación de agentes (por ejemplo, fármacos) que interactúan con uno o más componentes celulares que interactúan, directa o indirectamente, con la erastina. En una realización, la invención se refiere a un método para identificar un agente que interactúa con un componente celular que interactúa con la erastina, que comprende (a) poner en contacto una célula, un tejido, un órgano, un organismo o un lisado, o un extracto de uno de los anteriores, con erastina; (b) identificar un componente celular que interactúe (directa o indirectamente) con la erastina; (c) poner en contacto una célula, un tejido, un órgano, un organismo o un lisado, o un extracto de uno de los anteriores, con un agente candidato que sea un agente o un fármaco para ser evaluado por su capacidad para interactuar con uno o varios componentes celulares que interactúen con la erastina; y (d) determinar si el agente interactúa (directa o indirectamente) con el componente celular de (b). Si el agente interactúa con el componente celular de (b), es un agente que interactúa con un componente celular que interactúa con la erastina.

50 Un aspecto relacionado se refiere a métodos para la identificación de agentes (por ejemplo, fármacos) que interactúan con uno o más componentes celulares que se sabe que interactúan, directa o indirectamente, con la erastina, método que comprende: (a) poner en contacto una célula, un tejido, un órgano, un organismo o un lisado, o un extracto de uno de los anteriores, con un agente candidato que sea un agente o un fármaco que vaya a ser evaluado por su capacidad para interactuar con el/los componente/s celular/es que se sabe que interactúa/n con la erastina; y (b) determinar si el agente interactúa (directa o indirectamente) con el componente celular de (a). Si el agente interactúa con el componente celular de (a), es un agente que interactúa con el componente celular que interactúa con la erastina.

55 En ciertas realizaciones, la célula es una célula tumorigénica humana manipulada genéticamente. Otras realizaciones se refieren a compuestos que interactúan, directa o indirectamente, con uno o más componentes celulares que interactúan con la erastina. En ciertas realizaciones, el componente celular que interactúa con la erastina está implicado en la tumorigénesis. Un agente (por ejemplo, un fármaco) del que se ha demostrado que interactúa con un componente celular que interactúa con la erastina se sintetiza usando métodos conocidos.

60 También se describe un método para identificar un agente (por ejemplo, un fármaco) que induzca la muerte de células tumorales, tal como mediante un mecanismo apoptótico o un mecanismo no apoptótico. En una realización, un método de identificación de un agente que induce la muerte de células tumorales mediante un mecanismo no apoptótico comprende (a) poner en contacto células de ensayo, que son células tumorales, (o un órgano o tejido que contiene células tumorales) con un agente candidato que induzca la muerte de las células tumorales; (b) evaluar si el

agente de (a) induce la apoptosis de las células de ensayo; y (c) comparar la inducción de la apoptosis de las células de (b) con un control apropiado. Si se induce la apoptosis en las células de control, pero no en las células de ensayo, entonces se identifica un agente (por ejemplo, un fármaco) que induce la muerte de las células tumorales mediante un mecanismo no apoptótico. Un control adecuado es una célula que es del mismo tipo de célula que las células de ensayo, a excepción de que la célula de control se pone en contacto con un agente conocido para inducir la apoptosis en la célula. Un control apropiado se puede procesar de forma simultánea o puede estar preestablecido (por ejemplo, una referencia un patrón preestablecido). En ciertas realizaciones, las células de ensayo son células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente.

10 Como se usa en la presente memoria, "un", "uno" y "una" se refieren a una o más de las entidades a las que se refieren.

Ciertos aspectos proporcionan métodos para llevar a cabo un negocio de descubrimiento de fármacos. En una realización, la invención se refiere a un método para llevar a cabo un descubrimiento de fármacos que comprende:  
 15 (a) identificar un agente (por ejemplo, un fármaco) que sea selectivamente tóxico para las células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente; (b) evaluar la eficacia y la toxicidad de un agente identificado en (a), o análogos del mismo, en animales; y (c) formular una preparación farmacéutica que incluya uno o más agentes evaluados en (b). La eficacia evaluada puede ser la capacidad de un agente para inducir selectivamente la muerte celular en las células tumorigénicas de un animal. En otra realización más, el método para llevar a cabo un descubrimiento de fármacos comprende el establecimiento de un sistema de distribución para distribuir la preparación farmacéutica a nivel comercial. Opcionalmente, se establece un grupo de vendedores para la comercialización de la preparación farmacéutica. Una realización adicional se refiere a un método para llevar a cabo un negocio de proteómica, que comprende identificar un agente (por ejemplo, un fármaco) que sea selectivamente tóxico para las células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente y conceder las licencias, a un tercero, de los derechos para el posterior desarrollo farmacológico de agentes que sean selectivamente tóxicos para las células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente.

Otra realización se refiere a un método para llevar a cabo un negocio de descubrimiento de fármacos que comprende: (a) identificar uno o más agentes (por ejemplo, fármacos) que sean tóxicos para las células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente; (b) evaluar la eficacia y la toxicidad de un agente identificado en (a), o análogos del mismo, en animales; y (c) formular una preparación farmacéutica que incluya uno o más agentes evaluados en (b). Por ejemplo, el agente identificado es la erastina. La eficacia evaluada puede ser la capacidad de un agente para inducir selectivamente alteraciones en el crecimiento celular, la toxicidad o la muerte celular en las células tumorales de un animal. En una realización adicional, el método para llevar a cabo un negocio de descubrimiento de fármacos comprende el establecimiento de un sistema de distribución para distribuir la preparación farmacéutica a nivel comercial. Opcionalmente, se establece un grupo de vendedores para la comercialización de la preparación farmacéutica. Un aspecto más se refiere a un método para llevar a cabo un negocio de proteómica que comprende identificar un agente (por ejemplo, un fármaco) que sea tóxico para células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente y conceder las licencias, a un tercero, de los derechos para el desarrollo farmacológico posterior de agentes que sean tóxicos para células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente.

Otra realización más se refiere a un método para llevar a cabo un negocio de descubrimiento de fármacos que comprende: (a) identificar uno o más agentes (por ejemplo, fármacos) que interactúan con un componente celular que interactúa con la erastina; (b) evaluar la eficacia y la toxicidad de un agente identificado en (a), o análogos del mismo, en animales; y (c) formular una preparación farmacéutica que incluya uno o más agentes evaluados en (b). La eficacia evaluada puede ser la capacidad de un agente para inducir selectivamente la muerte celular de células tumorigénicas de un animal. En una realización adicional, el método para llevar a cabo un descubrimiento de fármacos comprende el establecimiento de un sistema de distribución para distribuir la preparación farmacéutica a nivel comercial. Opcionalmente, se establece un grupo de vendedores para la comercialización de la preparación farmacéutica. Un aspecto más se refiere a un método para llevar a cabo un negocio de proteómica que comprende identificar un agente (por ejemplo, un fármaco) que interactúe con un componente celular que interactúe con la erastina, y conceder las licencias, a un tercero, de los derechos para el desarrollo farmacológico posterior de agentes que interactúen con un componente celular que interactúe con la erastina.

También se describe un método de llevar a cabo un negocio de descubrimiento de fármacos que incluye:

(a) identificar un agente terapéutico candidato para inhibir la proliferación celular, en el que el agente terapéutico candidato es:

- (i) un agente que mejora o inhibe un nivel de una proteína VDAC;
- (ii) un agente que mejora o inhibe la actividad de una proteína VDAC;
- (iii) un agente que se une a una proteína VDAC;
- (iv) un agente que se une y/o modula un complejo proteico que comprende al menos una proteína VDAC y, opcionalmente, una o más de otras proteínas;
- (v) un agente que comprende un polipéptido VDAC o variantes funcionales del mismo;

- (vi) un agente que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido VDAC o variantes funcionales del mismo; o
- (vii) un compuesto divulgado en la presente memoria;

- 5 (b) realizar perfiles terapéuticos del agente terapéutico candidato identificado en la etapa (a) para la eficacia y la toxicidad en animales; y
- (c) formular una preparación farmacéutica que incluya uno o más de los agentes terapéuticos candidatos identificados en la etapa (b) por tener un perfil terapéutico aceptable.

10 En lugar de o además de una o ambas etapas (b) y (c), el método puede incluir la concesión de licencias a un tercero de los derechos para el posterior desarrollo del agente terapéutico candidato. En una realización adicional, el método para llevar a cabo un negocio de descubrimiento de fármacos comprende el establecimiento de un sistema de distribución para distribuir la preparación farmacéutica a nivel comercial. Opcionalmente, se establece un grupo de vendedores para la comercialización de la preparación farmacéutica.

15 Una realización adicional es un método de realización de un negocio farmacéutico que incluye:

- (a) identificar un agente terapéutico candidato para inhibir la proliferación celular, en el que el agente terapéutico candidato es:

- 20 (i) un agente que aumenta o inhibe una proteína VDAC; o
- (ii) un agente que aumenta o inhibe las interacciones entre una proteína VDAC y una segunda proteína; y

- 25 (b) conceder las licencias a un tercero de los derechos para el posterior desarrollo del agente terapéutico candidato.

En una realización adicional, el método para llevar a cabo un negocio de descubrimiento de fármacos comprende el establecimiento de un sistema de distribución para distribuir la preparación farmacéutica a nivel comercial. Opcionalmente, se establece un grupo de vendedores para la comercialización de la preparación farmacéutica.

30 Otro aspecto es un método de realización de un negocio farmacéutico que incluye uno o más entre negocio de comercialización, producción, concesión de licencias a un tercero de los derechos de comercialización y concesión de licencias a un tercero de los derechos de producción de un kit, en el que el kit comprende:

- 35 (a) uno o más reactivos para determinar los niveles de una proteína de unión a erastina, la actividad de una proteína de unión a erastina o ambas cosas en una muestra biológica; y
- (b) instrucciones para interpretar los resultados del ensayo.

40 En general, las instrucciones indican si los niveles y/o la actividad de la proteína de unión a erastina son normales, superiores o inferiores a su nivel y/o actividad deseados, de modo que sea posible determinar si el nivel y/o la actividad se ha de modificar o predecir si una terapia (parcialmente) dependiente del nivel y/o de la actividad (por ejemplo, quimioterapia contra el cáncer) será satisfactorio.

45 En ciertas realizaciones, las instrucciones incluyen orientación con respecto a uno o más entre niveles o actividad normales, inferiores y superiores de una proteína de unión a erastina.

En ciertas realizaciones, las instrucciones incluyen orientación con respecto al posterior tratamiento con uno o más entre:

- 50 (i) un agente que aumenta o inhibe el nivel de una proteína VDAC;
- (ii) un agente que aumenta o inhibe la actividad de una proteína VDAC;
- (iii) un agente que se une a una proteína VDAC;
- (iv) un agente que se une a, modula, o se une a y modula un complejo proteico que comprende al menos una
- 55 proteína VDAC y, opcionalmente, una o más de otras proteínas;
- (v) un agente que comprende un polipéptido VDAC o variantes funcionales del mismo;
- (vi) un agente que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido VDAC o variantes funcionales del mismo; y
- (vii) un compuesto divulgado en la presente memoria;

60 en base al nivel de una proteína de unión a erastina, la actividad de una proteína de unión a erastina o ambas cosas.

En ciertas realizaciones, las instrucciones incluyen orientación con respecto a si el tratamiento con uno o más de los siguientes será satisfactorio:

- 65 (i) un agente que aumenta o inhibe el nivel de una proteína VDAC;

- (ii) un agente que aumenta o inhibe la actividad de una proteína VDAC;
- (iii) un agente que se une a una proteína VDAC;
- (iv) un agente que se une a, modula, o se une a y modula un complejo proteico que comprende al menos una proteína VDAC y, opcionalmente, una o más de otras proteínas;
- (v) un agente que comprende un polipéptido VDAC o variantes funcionales del mismo;
- (vi) un agente que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido VDAC o variantes funcionales del mismo; y
- (vii) un compuesto divulgado en la presente memoria;

10 en base al nivel de una proteína de unión a erastina, la actividad de una proteína de unión a erastina o ambas cosas.

En ciertas realizaciones, las instrucciones incluyen orientación con respecto a la probabilidad de éxito de una terapia contra el cáncer basada en el nivel de una proteína de unión a erastina, la actividad de una proteína de unión a erastina o ambas cosas.

15 La identificación de las alteraciones genéticas que aumenten la sensibilidad de las células humanas hacia compuestos específicos puede permitir, en última instancia, la disección mecanicista de las redes de señalización oncogénica y el diseño de una quimioterapia específica de determinados tipos de tumores. Los solicitantes han desarrollado un proceso sistemático para descubrir moléculas pequeñas con una mayor actividad en las células que albergan determinados cambios genéticos. Con el uso de este sistema, se determinó que varios agentes antitumorales usados clínicamente son más potentes y más activos en presencia de determinados elementos genéticos. Además, se identificó un nuevo compuesto que mata selectivamente las células que expresan la oncoproteína T pequeña y la RAS oncogénica. Estas moléculas pequeñas dirigidas genéticamente también pueden servir como pistas para el desarrollo de fármacos contra el cáncer con un índice terapéutico favorable.

25 La presente invención proporciona además productos farmacéuticos envasados. En una realización, el producto farmacéutico envasado comprende: (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que es selectivamente tóxico para células tumorogénicas humanas manipuladas genéticamente; y (ii) instrucciones y/o una etiqueta sobre la administración del agente para el tratamiento de pacientes que tienen cáncer. En una realización particular, el agente es erastina. En otra realización, el producto farmacéutico envasado comprende: (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que es tóxico para células tumorogénicas humanas manipuladas genéticamente; y (ii) instrucciones y/o una etiqueta sobre la administración del agente para el tratamiento de pacientes que tienen cáncer. En otra realización relacionada, el producto farmacéutico envasado comprende: (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que interactúa con un componente celular que interactúa con la erastina; y (ii) instrucciones y/o una etiqueta sobre la administración del agente para el tratamiento de pacientes que tienen cáncer.

30 Las instrucciones o la etiqueta pueden estar almacenadas en un medio electrónico tal como CD, DVD, disquete, tarjeta de memoria, etc., que se puede leer con un ordenador.

40 La presente invención proporciona además el uso de cualquier agente identificado por la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, el uso de erastina o sus análogos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

45 En ciertas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además la administración conjunta de uno o más agentes, tales como agentes quimioterapéuticos, que típicamente destruyen las células a través de un mecanismo apoptótico. Los agentes adecuados para su uso en la reducción de la tasa de crecimiento de un tumor y en el tratamiento de un paciente que padece cáncer incluyen, pero sin limitación, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, proteínas, peptidomiméticos, ácidos nucleicos, anticuerpos y combinaciones de los mismos. Se contempla que todas las realizaciones de la invención se pueden combinar con una o más de otras realizaciones.

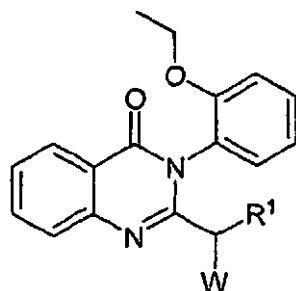
50 Otro aspecto se refiere a métodos de rastreo para identificar compuestos que supriman la toxicidad celular de una proteína en células manipuladas genéticamente, pero no sus células homólogas normales isogénicas. Estos métodos se han usado para identificar compuestos conocidos y nuevos con actividad selectiva del genotipo. Opcionalmente, estos compuestos tienen una mayor actividad en presencia de una proteína mutante.

55 También se describe un método para la identificación de agentes (por ejemplo, fármacos) que supriman selectivamente la toxicidad celular en células manipuladas genéticamente. Una realización se refiere a un método para identificar un agente (por ejemplo, un fármaco) que suprima la toxicidad celular de una proteína mutante en células manipuladas genéticamente, que comprende poner en contacto células de ensayo (por ejemplo, células manipuladas genéticamente que expresan una proteína mutante) con un agente candidato; determinar la viabilidad de las células de ensayo en contacto con el agente candidato; y comparar la viabilidad de las células de ensayo con la viabilidad de un control apropiado. Si la viabilidad de las células de ensayo es superior a la de las células de control, entonces se identifica un agente (por ejemplo, un fármaco) que suprime selectivamente la toxicidad celular. Un control apropiado es una célula que es del mismo tipo de célula que las células de ensayo, a excepción de que la célula de control no está manipulada genéticamente para expresar una proteína que produzca toxicidad. Por



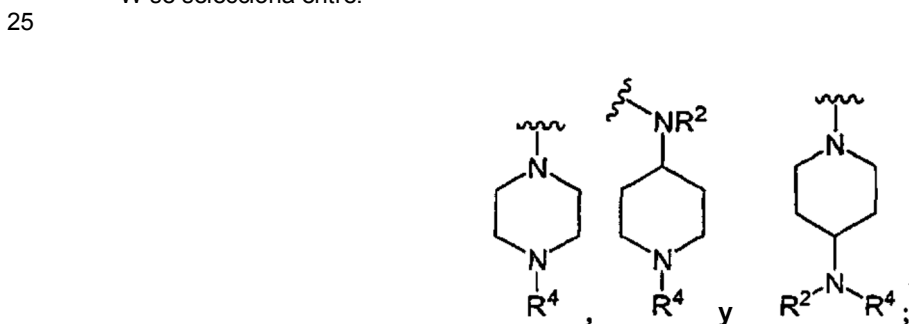
ejemplo, las células de control pueden ser las células primarias parentales de las que se han obtenido las células de ensayo. Las células de control se ponen en contacto con el agente candidato en las mismas condiciones que las células de ensayo. Se puede procesar un control apropiado de forma simultánea o puede estar preestablecido (por ejemplo, una referencia o un patrón preestablecido).

5 También se describen métodos para el tratamiento de una afección en un mamífero que comprenden administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de erastina, por ejemplo, un compuesto representado por la fórmula general I:



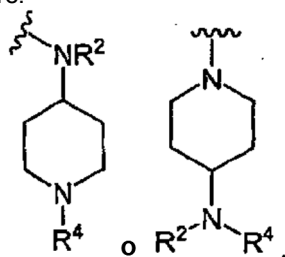
10 en los que la afección se caracteriza por células con la actividad de señalización de Ras aumentada y la actividad de una proteína diana celular del antígeno T pequeño de SV40 alterada (por ejemplo, reducida o aumentada); y, opcionalmente, un nivel sustancialmente de tipo natural de actividad de Rb, y en el que:

15  $R^1$  se selecciona entre H, -Z-Q-Z, -alquil  $C_{1-8}$ -N( $R^2$ )( $R^4$ ), -alquil  $C_{1-8}$ -OR<sup>3</sup>, resto carbocíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, arilo, heteroarilo y aralquilo  $C_{1-4}$ ;  
 cada  $R^2$  y  $R^4$  se selecciona independientemente para cada aparición entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo, heteroarilo, acilo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo, con la condición de que cuando tanto  $R^2$  como  $R^4$  estén en el mismo átomo de N y ninguno sea H, estos sean diferentes, y que cuando tanto  $R^2$  como  $R^4$  estén en el mismo N y bien  $R^2$  o  $R^4$  sea acilo, alquilsulfonilo o arilsulfonilo, entonces el otro se seleccione entre H, alquilo  $C_{1-8}$ , arilo, aralquilo  $C_{1-4}$  y heteroarilo;  
 20  $R^3$  se selecciona entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo y heteroarilo;  
 W se selecciona entre:



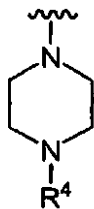
30 Q se selecciona entre O y NR<sup>2</sup>; y  
 Z se selecciona independientemente para cada aparición entre alquilo  $C_{1-6}$ , alquenilo  $C_{2-6}$  y alquinilo  $C_{2-6}$ . Cuando Z es un grupo alquenilo o alquinilo, el enlace o los enlaces dobles o triples, preferiblemente, no están en el extremo del grupo (excluyéndose así, por ejemplo, los enoléteres, los alquínoléteres, las enaminas y/o las inaminas).

En ciertas realizaciones, W se selecciona entre:



35 En ciertas de tales realizaciones,  $R^1$  se selecciona entre -Z-Q-Z, -alquil  $C_{1-8}$ -N( $R^2$ )( $R^4$ ), -alquil  $C_{1-8}$ -OR<sup>3</sup>, arilo, heteroarilo y aralquilo  $C_{1-4}$ .

En ciertas realizaciones, W es



5 En ciertas de tales realizaciones, R<sup>1</sup> se selecciona entre -Z-Q-Z, -alquil C<sub>1-8</sub>-N(R<sup>2</sup>)(R<sup>4</sup>), -alquil C<sub>1-8</sub>-OR<sup>3</sup>, arilo, heteroarilo y aralquilo C<sub>1-4</sub>.

En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> se selecciona entre -Z-Q-Z, -alquil C<sub>1-8</sub>-N(R<sup>2</sup>)(R<sup>4</sup>), -alquil C<sub>1-8</sub>-OR<sup>3</sup>, arilo, heteroarilo y aralquilo C<sub>1-6</sub>.

10 En ciertas realizaciones, R<sup>4</sup> se selecciona entre aralquilo C<sub>1-4</sub> y acilo. En ciertas de tales realizaciones, R<sup>4</sup> es acilo.

15 En ciertas realizaciones en las que R<sup>4</sup> es acilo, R<sup>4</sup> es -C(O)-alquil C<sub>1-3</sub>-Y e Y se selecciona entre H, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, arilo, heteroarilo, heteroariloxilo y cicloalquilo. En ciertas de tales realizaciones, Y se selecciona entre ariloxilo, arilo, heteroarilo, heteroariloxilo y cicloalquilo. En tales realizaciones preferidas, Y se selecciona entre ariloxilo y heteroariloxilo. En tales realizaciones más preferidas, alquil C<sub>1-3</sub>-Y es -CH<sub>2</sub>O-fenilo, en el que el fenilo está opcionalmente sustituido con halógeno, preferiblemente cloro. En ciertas realizaciones preferidas en las que Y es -CH<sub>2</sub>O-fenilo, el resto de los valores se selecciona de modo que la erastina se excluye de la realización.

20 En ciertas realizaciones, arilo está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo C<sub>1-6</sub>, CF<sub>3</sub>, hidroxilo, alcoxilo C<sub>1-4</sub>, arilo, ariloxilo, halógeno, -NR<sup>2</sup>R<sup>4</sup>, nitro, ácido carboxílico, éster carboxílico y sulfonilo.

Los agentes adecuados pueden tener la actividad citada en la forma existente, o tras un metabolismo completo o parcial.

25 En ciertas realizaciones, la afección se caracteriza por células con un nivel sustancialmente de tipo natural de actividad de Rb. En ciertas de tales realizaciones, las células se caracterizan además por una mayor actividad de señalización de Ras y/o una actividad alterada (por ejemplo, reducida o aumentada) de una proteína diana celular del antígeno T pequeño de SV40.

30 En ciertas realizaciones, el compuesto destruye las células mediante un mecanismo no apoptótico.

En ciertas realizaciones, el compuesto destruye las células mediante un mecanismo distinto de un mecanismo no apoptótico.

35 En ciertas realizaciones, las células tienen una mejor actividad de la vía de Ras (por ejemplo, Ras<sup>V12</sup>), sobreexpresan el antígeno T pequeño de SV40, tienen una actividad sustancialmente reducida de la fosfatasa PP2A y/o modulan (por ejemplo, potencian o inhiben) los niveles o la actividad de VDAC tales como VDAC2 o VDAC3.

40 En ciertas realizaciones, la afección es cáncer.

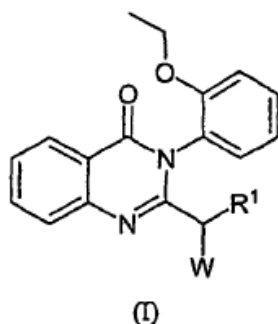
En ciertas realizaciones, las células son inducidas a expresar el antígeno T pequeño de SV40, por ejemplo, mediante la infección de dichas células con un vector viral que sobreexpresa el antígeno T pequeño de SV40 tal como un vector retroviral o un vector adenoviral.

45 En ciertas realizaciones, el vector viral es un vector retroviral o un vector adenoviral.

50 En ciertas realizaciones, el método comprende además administrar conjuntamente a dicho mamífero un agente, tal como un agente quimioterapéutico, que destruye las células a través de un mecanismo apoptótico. En ciertas realizaciones, el agente administrado conjuntamente se selecciona entre: un antagonista del receptor de EGF, sulfuro arsénico, adriamicina, cisplatino, carboplatino, cimetidina, carminomicina, clorhidrato de mecloretamina, pentametilmelamina, tiotepa, tenipósido, ciclofosfamida, clorambucil, demetoxihipocrelina A, melfalán, ifosfamida, trofosfamida, Treosulfán, podofilotoxina o derivados de podofilotoxina, fosfato de etopósido, tenipósido, etopósido, leurosina, vindesina, 9-aminocamptotecina, camptoirinotecán, crinamol, megestrol, metopterina, mitomicina C, ecteinascidina 743, busulfán, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), lovastatina, ión de 1-metil-4-fenilpiridinio, semustina, estaurosporina, estreptozocina, ftalocianina, dacarbazina, aminopterina, metotrexato, trimetrexato, tioguanina, mercaptopurina, fludarabina, pentastatina, cladribina, citarabina (ara C), porfiromicina, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, clorhidrato de doxorubicina, leucovorina, ácido micofenólico, daunorubicina, deferoxamina, floxuridina, doxifluridina, raltitrexed, idarubicina, epirubicina, pirarubicina, zorubicina, mitoxantrona, sulfato de bleomicina, actinomicina D, safracinas, saframincinas, quinocarcinas, discodermolidas, vincristina,

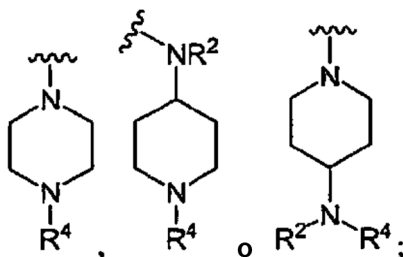
vinblastina, tartrato de vinorelbina, vertoporfina, paclitaxel, tamoxifeno, raloxifeno, tiazofurano, tioguanina, ribavirina, EICAR, estramustina, fosfato sódico de estramustina, flutamida, bicalutamida, buserelina, leuprolida, pteridinas, enedíinas, levamisol, aflacón, interferón, interleucinas, aldesleucina, filgrastim, sargramostim, rituximab, BCG, tretinoína, betametasona, clorhidrato de gemcitabina, verapamilo, VP-16, altretamina, tapsigargina, oxaliplatino, 5  
 5 iproplatino, tetraplatino, lobaplatino, DCP, PLD-147, JM118, JM216, JM335, satraplatino, docetaxel, paclitaxel desoxigenado, TL-139, 5'-nor-anhidrovinblastina (de aquí en adelante: 5'-nor-vinblastina), camptotecina, irinotecán (Camptosar, CPT-11), topotecán (Hicamptina), BAY 38-3441, 9-nitrocampotecina (Oretecina, rubitecán), exatecán (DX-8951), lurtotecán (GI-147211C), gimatecán, homocampotecina, diflomotecán (BN-80915) y 9-aminocampotecina (IDEC-13'), SN-38, ST1481, karanitecina (BNP1350), indolocarbazoles (por ejemplo, NB-506),  
 10 protoberberinas, intoplicinas, idenoisoquinolonas, benzofenacinas o NB-506.

Otro aspecto proporciona un método para destruir una célula, potenciar la muerte celular o inhibir la proliferación celular, que comprende administrar a la célula: (1) una cantidad eficaz de un compuesto representado por la fórmula general I:  
 15



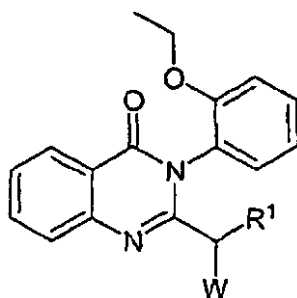
en la que:

20  $R^1$  se selecciona entre H, -Z-Q-Z, -alquil  $C_{1-8}$ -N( $R^2$ )( $R^4$ ), -alquil  $C_{1-8}$ -OR<sup>3</sup>, resto carbocíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, arilo, heteroarilo y aralquilo  $C_{1-4}$ ;  
 cada  $R^2$  y  $R^4$  se selecciona independientemente para cada aparición entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo, heteroarilo, acilo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo, con la condición de que cuando tanto  $R^2$  como  $R^4$  estén en el mismo átomo de N y ninguno sea H, estos sean diferentes, y que cuando tanto  $R^2$  como  $R^4$  estén en el mismo N  
 25 y bien  $R^2$  o  $R^4$  sea acilo, alquilsulfonilo o arilsulfonilo, entonces el otro se seleccione entre H, alquilo  $C_{1-8}$ , arilo, aralquilo  $C_{1-4}$  y heteroarilo;  
 $R^3$  se selecciona entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo y heteroarilo;  
 W se selecciona entre



30 Q se selecciona entre O y NR<sup>2</sup>; y  
 Z se selecciona independientemente para cada aparición entre alquilo  $C_{1-6}$ , alqueno  $C_{2-6}$  y alquino  $C_{2-6}$  (cuando Z es un grupo alqueno o alquino, preferiblemente, el enlace o los enlaces dobles o triples no están en el extremo del grupo); y  
 35 (2) un agente que aumente la abundancia de VDAC (por ejemplo, VDAC2, VDAC3) en la célula.

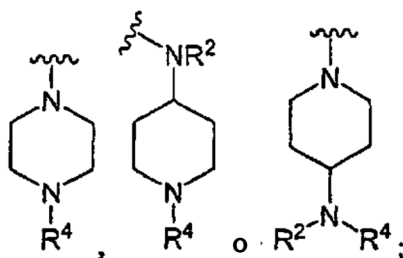
Otro aspecto proporciona un método para destruir una célula que comprende administrar a la célula: (1) una cantidad eficaz de un compuesto representado por la fórmula general I:



(I)

en la que:

- 5 R<sup>1</sup> se selecciona entre H, -Z-Q-Z, -alquil C<sub>1-8</sub>-N(R<sup>2</sup>)(R<sup>4</sup>), -alquil C<sub>1-8</sub>-OR<sup>3</sup>, resto heterocíclico o carbocíclico de 3 a 8 miembros, arilo, heteroarilo y aralquilo C<sub>1-4</sub>;
- 6 cada R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> se selecciona independientemente para cada aparición entre H, alquilo C<sub>1-4</sub>, aralquilo C<sub>1-4</sub>, arilo, heteroarilo, acilo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo, con la condición de que cuando ambos R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> estén en el mismo átomo de N y ninguno sea H, estos sean diferentes, y que cuando ambos R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> estén en el mismo N y bien R<sup>2</sup> o R<sup>4</sup> sea acilo, alquilsulfonilo o arilsulfonilo, entonces el otro se seleccione entre H, alquilo C<sub>1-8</sub>, arilo, aralquilo C<sub>1-4</sub> y heteroarilo;
- 10 R<sup>3</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1-4</sub>, aralquilo C<sub>1-4</sub>, arilo y heteroarilo;
- W se selecciona entre



- 15 Q se selecciona entre O y NR<sup>2</sup>; y
- Z se selecciona independientemente para cada aparición entre alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub> y alquinilo C<sub>2-6</sub> (cuando Z es un grupo alquenilo o alquinilo, el enlace o los enlaces dobles o triples, preferiblemente, no están en el extremo del grupo); y
- 20 (2) un agente que disminuye la abundancia de VDAC (por ejemplo, VDAC2, VDAC3) en la célula.

Se divulga además un método de potenciar la muerte celular que incluye administrar a la célula una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I).

25 En ciertas realizaciones, el compuesto es como se describe anteriormente.

En ciertas realizaciones, la célula es una célula cancerosa.

30 En ciertas realizaciones, el agente comprende un polinucleótido que codifica una VDAC tal como VDAC3.

En ciertas realizaciones, el agente es una proteína VDAC (por ejemplo, VDAC3) adaptada a ser transportada en la célula, por ejemplo, fusionada con un dominio de internalización heterólogo.

35 En ciertas realizaciones, el agente es una preparación de liposomas que comprende una proteína VDAC (por ejemplo, VDAC3).

En ciertas realizaciones, el agente de mejora o inhibe la expresión endógena de VDAC (por ejemplo, VDAC3), estimula o suprime la expresión de VDAC (por ejemplo, VDAC3), o mejora o inhibe la función de un inhibidor de VDAC (por ejemplo, VDAC3).

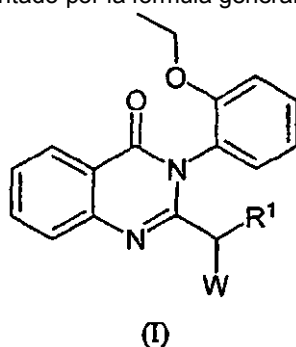
40 En ciertos aspectos, el método también implica la administración de un agente que aumenta la abundancia de VDAC (por ejemplo, VDAC1, VDAC2, VDAC3) en la célula. En ciertos aspectos, el método también implica la administración de un agente que disminuye la abundancia de VDAC (por ejemplo, VDAC1, VDAC2, VDAC3) en la célula.

45

Otro aspecto es un método para aumentar la sensibilidad de una célula tumoral a un agente quimioterapéutico (por ejemplo, de manera aditiva o sinérgica), en el que se pone en contacto una célula tumoral con un compuesto divulgado en la presente memoria. Un aspecto relacionado es un método para reducir la sensibilidad de una célula normal a un agente quimioterapéutico, en el que se pone en contacto una célula normal con un compuesto divulgado en la presente memoria.

Una realización es un método de identificación de pacientes que son propensos a responder a un tratamiento con compuestos de la invención. Con el uso de métodos estándar de caracterización conocidos en la técnica, se esperaría que fueran sensibles los pacientes identificados como poseedores de neoplasias que muestran uno o más de los siguientes atributos: actividad anómala de la vía de señalización de Ras caracterizada por la activación de uno o más miembros de la vía (por ejemplo, Erk1/2 fosforilada, MEK fosforilada, etc.) y/o expresión de proteínas de VDAC (1, 2 o 3) y/o sensibilidad de una línea celular de genotipo similar o idéntico a la exposición de los compuestos de la invención *in vitro* o *in vivo*.

También se describe un compuesto representado por la fórmula general I:



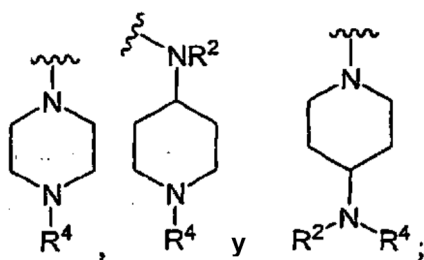
en la que:

$R^1$  se selecciona entre H, Z-Q-Z, -alquil  $C_{1-8}$ -N( $R^2$ )( $R^4$ ), -alquil  $C_{1-8}$ -OR<sup>3</sup>, resto carbocíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, arilo, heteroarilo y aralquilo  $C_{1-4}$ ;

cada  $R^2$  y  $R^4$  se selecciona independientemente para cada aparición entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo, heteroarilo, acilo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo, con la condición de que cuando ambos  $R^2$  y  $R^4$  estén en el mismo átomo de N, estos sean diferentes (excepto en ciertas realizaciones en las que ambos  $R^2$  y  $R^4$  son H) y que cuando ambos  $R^2$  y  $R^4$  estén en el mismo N y bien  $R^2$  o  $R^4$  sea acilo, alquilsulfonilo o arilsulfonilo, entonces el otro se seleccione entre H, alquilo  $C_{1-8}$ , arilo, aralquilo  $C_{1-4}$  y heteroarilo;

$R^3$  se selecciona entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo y heteroarilo;

W se selecciona entre

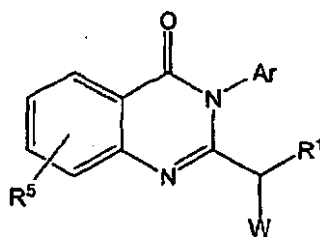


Q se selecciona entre O y NR<sup>2</sup>; y

Z se selecciona independientemente para cada aparición entre alquilo  $C_{1-6}$ , alquenilo  $C_{2-6}$  y alquinilo  $C_{2-6}$  y cuando Z es un grupo alquenilo o alquinilo, preferiblemente, el enlace o los enlaces dobles o triples no están en el extremo del grupo,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro aspecto proporciona un compuesto representado por la fórmula general II:



(II)

en la que:

Ar es un fenilo sustituido;

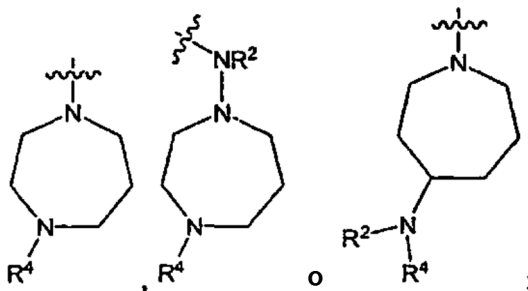
5  $R^1$  se selecciona entre H, alquilo  $C_{1-8}$ , -Z-Q-Z, -alquil  $C_{1-8}$ -N( $R^2$ )( $R^4$ ), -alquil  $C_{1-8}$ -OR<sup>3</sup>, resto carbocíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, arilo, heteroarilo y aralquilo  $C_{1-4}$ ;

cada  $R^2$  y  $R^4$  se selecciona independientemente para cada aparición entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo, heteroarilo, acilo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo, con la condición de que cuando ambos  $R^2$  y  $R^4$  estén en el mismo N y bien  $R^2$  o  $R^4$  sea acilo, alquilsulfonilo o arilsulfonilo, entonces el otro se seleccione entre H, alquilo  $C_{1-8}$ , arilo, aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo y heteroarilo;

10  $R^3$  se selecciona entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo y heteroarilo;

$R^5$  representa 0-4 sustituyentes en el anillo al que está unido;

W es



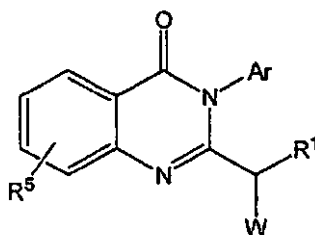
15

Q se selecciona entre O y NR<sup>2</sup>; y

Z se selecciona independientemente para cada aparición entre alquilo  $C_{1-6}$ , alquenilo  $C_{2-6}$  y alquinilo  $C_{2-6}$ . Cuando Z es un grupo alquenilo o alquinilo, el enlace o los enlaces dobles o triples, preferiblemente, no están en el extremo del grupo.

20

Otro aspecto proporciona un compuesto representado por la fórmula general III:



(III)

25 en la que:

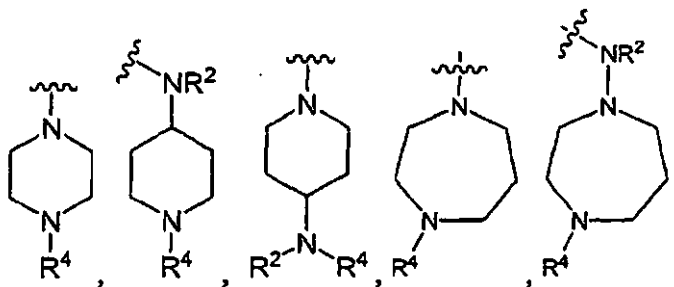
Ar es un fenilo sustituido o no sustituido;

$R^1$  se selecciona entre H, alquilo  $C_{1-8}$ , -Z-Q-Z, -alquil  $C_{1-8}$ -N( $R^2$ )( $R^4$ ), -alquil  $C_{1-8}$ -OR<sup>3</sup>, resto carbocíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, arilo, heteroarilo y aralquilo  $C_{1-4}$ ;

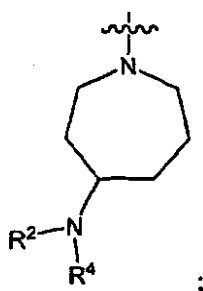
30 Cada  $R^2$  y  $R^4$  se selecciona independientemente para cada aparición entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo, heteroarilo, acilo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo, con la condición de que cuando ambos  $R^2$  y  $R^4$  estén en el mismo átomo de N y bien  $R^2$  o  $R^4$  sea acilo, alquilsulfonilo o arilsulfonilo, entonces el otro se seleccione entre H, alquilo  $C_{1-8}$ , arilo, aralquilo  $C_{1-4}$  y heteroarilo;

$R^3$  se selecciona entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo y heteroarilo;

R<sup>5</sup> representa 0-4 sustituyentes en el anillo al que está unido;  
 W se selecciona entre



o



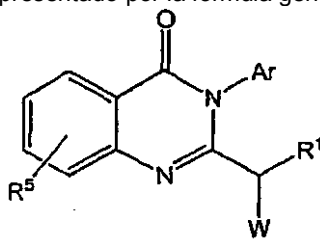
5

Q se selecciona entre O y NR<sup>2</sup>; y

Z se selecciona independientemente para cada aparición entre alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub> y alquinilo C<sub>2-6</sub>.  
 Cuando Z es un grupo alquenilo o alquinilo, el enlace o los enlaces dobles o triples, preferiblemente, no están en el extremo del grupo.

10

Otro aspecto proporciona un compuesto representado por la fórmula general IV:



(IV)

en la que:

15

Ar es un fenilo sustituido o no sustituido;

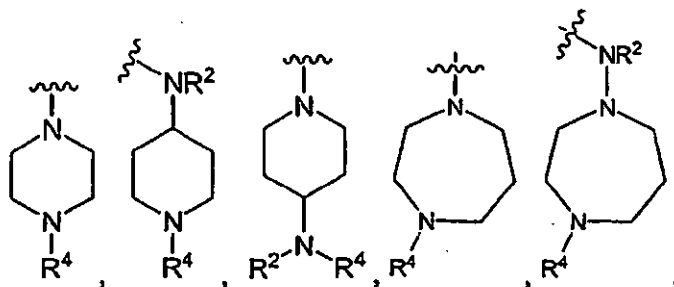
R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>1-8</sub>;

Cada R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> se selecciona independientemente para cada aparición entre H y alquilo C<sub>1-8</sub>;

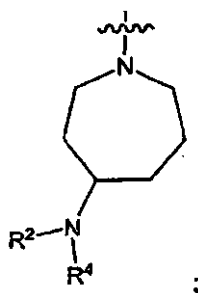
R<sup>5</sup> representa 0-4 sustituyentes en el anillo al que está unido;

20

W se selecciona entre

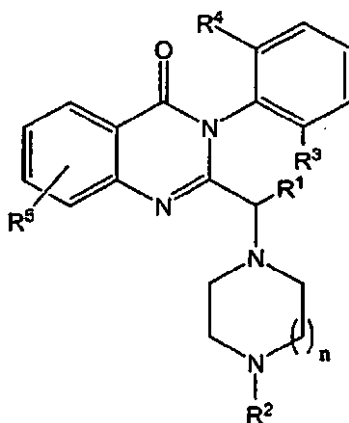


o



y  
Q se selecciona entre O y NR<sup>2</sup>.

5 Otro aspecto proporciona un compuesto representado por la fórmula general V:



(V)

en la que:

- 10 R<sup>1</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1-8</sub>;  
 R<sup>2</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1-8</sub>;  
 R<sup>3</sup> se selecciona entre halógeno, alcoxilo C<sub>1-8</sub> y alquilo C<sub>1-8</sub>;  
 R<sup>4</sup> se selecciona entre H, halógeno, alcoxilo C<sub>1-8</sub> y alquilo C<sub>1-8</sub>;  
 R<sup>5</sup> se selecciona entre H, halógeno y nitro; y  
 15 n es 1 o 2.

Se contempla que cualquiera de los compuestos representados por las fórmulas I-V anteriores se pueden usar en un método para 1) tratar una afección en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto; 2) destruir una célula que comprende administrar a la célula a) una cantidad eficaz de dicho compuesto y b) un agente que aumente la abundancia de VDAC (por ejemplo, VDAC2, VDAC3) en la célula; o 3) destruir una célula que comprende administrar a la célula a) una cantidad eficaz de dicho compuesto y b) un agente que disminuya la abundancia de VDAC (por ejemplo, VDAC2, VDAC3) en la célula.

Se contempla la posibilidad de combinar todas las realizaciones de la invención con una o más de otras realizaciones, incluso con aquellas descritas en diferentes aspectos de la invención. En ciertas realizaciones de la invención, un compuesto o un agente no es un compuesto divulgado en la Tabla 2.

#### Breve descripción de las figuras

30 La Figura 1 es un esquema que muestra las relaciones entre células humanas transformadas experimentalmente. Las células BJ son fibroblastos primarios de prepucio humano. Las células BJ-TERT se obtienen de células BJ y expresan hTERT, la subunidad catalítica de la enzima telomerasa. Las células BJ-TERT/LT/ST se obtienen de células BJ-TERT mediante la introducción de una construcción genómica que codifica las oncoproteínas T de virus de simio tanto grande (LT) como pequeña (ST). Las células tumorales BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> se obtienen de células BJ-TERT/LT/ST mediante la introducción de un alelo oncogénico de HRAS (RAS<sup>V12</sup>) (Hahn *et al.*, 1999, *Nat Med* 5, 1164-70). Las células BJ-TERT/LT/RAS<sup>V12</sup> se obtienen de células BJ mediante la introducción de construcciones de ADNc que codifican TERT, LT, RAS<sup>V12</sup> y un vector de control (Hahn *et al.*, 2002, *Nat Rev Cancer* 2, 331-41). Las células BJ-TERT/LT/RAS<sup>V12</sup>/ST se obtienen de células BJ-TERT/LT/RAS<sup>V12</sup> mediante la introducción de un ADNc que codifica ST (Hahn *et al.*, 2002, *Nat Rev*



- Cancer* 2, 331-41). Las células TIP5 son fibroblastos primarios de prepucio humano. Las líneas celulares derivadas de TIP5 se prepararon mediante la introducción de vectores que codifican hTERT, LT, ST, RAS, o las proteínas E6 o E7 del virus del papiloma como se muestra. E6 y E7 pueden sustituir conjuntamente a LT (Lessnick *et al.*, 2002, *Cancer Cell* 1, 393-401).
- 5 La Figura 2 muestra las estructuras químicas de nueve compuestos selectivos del genotipo.  
La Figura 3 muestra representaciones gráficas del efecto de la equinomicina y la camptotecina en células manipuladas genéticamente. Las células indicadas se trataron con equinomicina (A) o camptotecina (B, C) en placas de 384 pocillos durante 48 horas. Se muestra el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, medida usando AM de calceína. Las barras de error indican una desviación estándar. (A) Células BJ, BJ-TERT, BJ-TERT/LT/ST y BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> tratadas con equinomicina; (B) células BJ, BJ-TERT, BJ-TERT/LT/ST y BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> tratadas con camptotecina; y (c) células BJ-TERT/LT/RAS<sup>V12</sup>, BJ-TERT/LT/RAS<sup>V12</sup>/ST y BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> tratadas con camptotecina.
- 10 La Figura 4 muestra representaciones gráficas del efecto de la erastina en células manipuladas genéticamente. Las células indicadas se trataron con erastina en placas de 384 pocillos durante 48 horas. Se muestra el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular medido usando AM de calceína. Las barras de error indican una desviación estándar. (A) Células BJ, BJ-TERT, BJ-TERT/LT/ST y BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> tratadas con erastina; (B) células BJ-TERT/LT/RAS<sup>V12</sup> (carentes de ST), BJ-TERT/LT/RAS<sup>V12</sup>/ST (células tumorigénicas) y BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> (células tumorigénicas) tratadas con erastina; y (C) células TIP5/TERT, TIP5/TERT/E6, TIP5/TERT/LT, TIP5/TERT/LT/ST y TIP5/TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> obtenidas independientemente.
- 15 La Figura 5 muestra que las dianas proteicas de compuestos selectivos de un tumor se sobreexpresan en células tumorigénicas manipuladas genéticamente. (A-C) Transferencia Western de lisados de células BJ, BJ-TERT, BJ-TERT/LT/ST, BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup>, BJ-TERT/LT/RAS<sup>V12</sup> y BJ-TERT/LT/RAS<sup>V12</sup>/ST con un anticuerpo dirigido contra la topoisomerasa II (A) o TOPI (B, C). En el panel (C), las células se transfectaron con un siARN dirigido contra TOPI, A/C láamico o con un dúplex de ADN bicatenario de control de la misma longitud (ADNbc de TOPI). En cada caso, la transferencia se sondeó con un anticuerpo contra eIF-4E para identificar las diferencias en la cantidad de proteína cargada. La cantidad relativa se cuantifica bajo cada banda. (D) Un siARN de TOPI previene la muerte celular causada por la camptotecina en células tumorales manipuladas genéticamente. Se determinó el número de células después de la transfección con un siARN dirigido contra TOPI y el tratamiento con las concentraciones indicadas de camptotecina. (E) El ácido ocadaico, un inhibidor de la PP2A y otras fosfatasa celulares, sensibiliza a las células humanas primarias hacia la camptotecina. Se trataron simultáneamente las células primarias BJ con las concentraciones indicadas tanto de camptotecina como de ácido ocadaico, y se determinó el efecto en la tinción de viabilidad con AM de calceína. Aunque el ácido ocadaico mata las células BJ a las concentraciones más altas analizadas, a 3,4 nM no tiene ningún efecto por sí solo, sino que vuelve las células BJ sensibles a la camptotecina. (F) El ácido ocadaico estimula la expresión de TOP1. Se trataron células primarias BJ con las concentraciones indicadas de ácido ocadaico y se determinó el nivel de expresión de TOPI mediante transferencia Western. La cantidad relativa se cuantifica bajo cada banda.
- 20 La Figura 6 muestra que la erastina induce la muerte celular rápida de una forma dependiente de ST/RAS<sup>V12</sup>. (A) Efecto en función del tiempo de la erastina sobre células BJ-TERT y BJ-TERTILT/ST/RAS<sup>V12</sup>. Se sembraron las células en placas de 384 pocillos en presencia de las concentraciones indicadas de erastina. Se determinó la inhibición de la viabilidad celular después de 24, 48 y 72 horas usando AM de calceína. (B) Efecto de la erastina en la tinción de viabilidad con azul Alamar en células BJ-TERT (rojo) y BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> (azul). (C) Fotografía de células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> y células primarias BJ tratadas con erastina. Se dejó que las células se unieran durante la noche, luego se trataron con erastina 9 μM durante 24 horas y se fotografiaron.
- 25 La Figura 7 muestra que la camptotecina, pero no la erastina, induce características de la apoptosis. (A) Las células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> tratadas con camptotecina, pero no con erastina presentaron núcleos fragmentados (10-20% de los núcleos totales, flechas rojas y azules) como se muestra. (B) Las células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> tratadas con camptotecina, pero no con erastina presentan tinción con Anexina V. Los porcentajes de células en la región M1 indicada fueron del 6%, 6% y 38% en las no tratadas, tratadas con erastina (9 μM) y tratadas con camptotecina (1 μM), respectivamente. (C) Las células BJ-TERTILT/ST/RAS<sup>V12</sup> tratadas con camptotecina, pero no con erastina albergan caspasa 3 activada. Se analizaron los lisados de muestras tratadas con camptotecina y erastina mediante transferencia Western con un anticuerpo dirigido contra la forma activa escindida de la caspasa 3. Se volvió a sondar la transferencia con un anticuerpo dirigido contra eIF4E para controlar los niveles de carga.
- 30 La Figura 8 muestra las estructuras químicas de la erastina y la erastina B.  
La Figura 9 muestra que los núcleos permanecen intactos en las células tumorales tratadas con erastina.  
La Figura 10 muestra que la erastina induce la formación de especies de oxígeno reactivas.  
La Figura 11 muestra la estructura química de la erastina A.  
La Figura 12 indica que la expresión de VDAC3 es significativamente elevada en las células BJELR tumorigénicas con respecto a la de las células BJEH no tumorigénicas.
- 35 La Figura 13 muestra los niveles de expresión relativa de las isoformas de VDAC en células diana usando el nivel

- de VDAC-1 establecido en el 100%.
- La Figura 14 muestra las proteínas identificadas mediante transferencia Western y electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de experimentos de interacción con el uso de extracto mitocondrial con derivados de erastina activos (A6) e inactivos (B1) inmovilizados.
- 5 La Figura 15 muestra los compuestos 12, 13 y 5 en ensayos de MCL en (a) células HCT116, (b) células DLD-1, (c) células OVCAR-3 y (d) células BT549.
- La Figura 16 muestra los compuestos 12, 13 y 5 en ensayos de MCL en (a) células MiaPaca2, (b) células DU145, (c) células SK-Mel 28 y (d) células Malm3M.
- La Figura 17 muestra los compuestos 12, 13 y 5 en ensayos de MCL en (a) células BT549, (b) células MCF-7, (c) 10 células HOP-92 y (d) células HOP-62.
- La Figura 18 muestra la inducción de la inhibición del crecimiento tumoral en xenoinjertos HT-1080 mediante el compuesto 6.
- La Figura 19 muestra la inducción de la regresión de tumores sólidos en xenoinjertos HT-1080 mediante el compuesto 5.
- 15 La Figura 20 muestra las tendencias del peso corporal en xenoinjertos HT-1080 mediante el compuesto 5.
- La Figura 21 muestra la inducción de la inhibición del crecimiento tumoral en xenoinjertos PANC-1 mediante el compuesto 6.
- La Figura 22 muestra la inducción de la regresión tumoral en xenoinjertos PANC-1 mediante el compuesto 5.

## 20 Descripción detallada de la invención

La capacidad de los compuestos selectivos del genotipo para servir como sondas moleculares se basa en la premisa de genética química de que las moléculas pequeñas se pueden usar para identificar proteínas y vías subyacentes a efectos biológicos (Schreiber, 1 998, *Bioorg. Med. Chem.* 6, 1127-1152; Stockwell, 2000, *Nat Rev Genet* 1, 116-25; 25 Stockwell, 2000, *Trends Biotechnol* 18, 449-55). Por ejemplo, la observación de que el producto natural rapamicina retarda el crecimiento celular hizo posible el descubrimiento de la diana de mamífero de la rapamicina (mTOR) como una proteína que regula el crecimiento celular (Brown *et al.*, 1994, *Nature* 369, 756-758; Sabatini *et al.*, 1994, *Cell* 78, 35-43). Los solicitantes han combinado estos dos enfoques, la genética química y molecular, para descubrir las vías afectadas por mutaciones asociadas con enfermedades humanas tales como el cáncer.

30 Los solicitantes han diseñado mediante ingeniería genética una serie de células tumorales humanas con elementos genéticos definidos para su uso en la identificación de aquellas vías de importancia fundamental cuya interrupción conduce a un fenotipo tumorigénico. (Hahn *et al.*, 1999, *Nat Med* 5, 1164-70; Hahn *et al.*, 2002, *Nat Rev Cancer* 2,331-41; Lessnick *et al.*, 2002, *Cancer Cell* 1, 393-401). Los solicitantes postularon que estas células transformadas experimentalmente harían posible la identificación de agentes selectivos del genotipo de fuentes tanto de 35 compuestos conocidos como de compuestos nuevos que presentan letalidad sintética en presencia de determinados alelos relacionados con el cáncer. Los compuestos con letalidad selectiva del genotipo pueden servir como sondas moleculares de las redes de señalización presentes en las células tumorales y como pistas para un posterior desarrollo de fármacos clínicamente eficaces con un índice terapéutico favorable y/o como un fármaco eficaz.

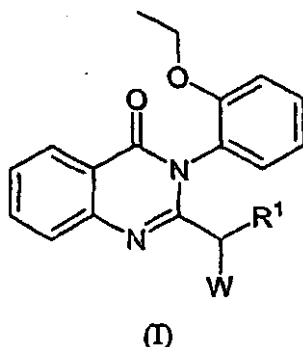
40 Con el uso de este enfoque, los solicitantes han llevado a cabo varios estudios de rastreo de alto rendimiento de bibliotecas de compuestos naturales y sintéticos, y han identificado compuestos que presentan fuertes actividades para combatir el cáncer. Entre estos compuestos están la erastina y los análogos de erastina tales como la erastina B y la erastina A. No obstante, se puede usar una amplia variedad de agentes o compuestos de ensayo en los 45 estudios de rastreo (por ejemplo, métodos de identificación de candidatos antitumorales) descritos en la presente memoria. Tales agentes de ensayo incluyen, pero sin limitación, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, peptidomiméticos, proteínas (incluyendo anticuerpos), ácidos nucleicos e hidratos de carbono.

50 Así pues, la invención proporciona compuestos de fórmula I según lo definido en las reivindicaciones que destruyen las células cancerosas, especialmente las células cancerosas específicas del genotipo tales como aquellas con una alta actividad de señalización de Ras, actividad dirigida al antígeno T pequeño de SV40 alterada y/o actividad de Rb sustancialmente intacta.

55 Los solicitantes también han identificado varias proteínas celulares que se unen directa o indirectamente a la erastina y/o a sus análogos. Estas proteínas incluyen: canales de aniones dependientes del voltaje (VDAC1, VDAC2 y VDAC3), prohibitina, riboforina, Sec61a y Sec22b. La PCR inversa cuantitativa también sugiere que las células sensibles a la muerte mediada por la erastina tienen niveles elevados (por ejemplo, 2-6 veces superiores, típicamente 2-2,5 veces superiores) de expresión de VDAC3. Aunque no se desea quedar vinculados a ninguna teoría en particular, estos experimentos sugieren que los altos niveles de expresión de VDAC, particularmente de 60 VDAC3 y VDAC2, aumentan la muerte celular mediada por la erastina (y su análogo), e incluso pueden ser necesarios para su eficacia.

65 Así pues, un aspecto proporciona un método para destruir selectivamente células cancerosas, especialmente aquellas con una actividad elevada de Ras, una actividad dirigida al antígeno T pequeño de SV40 alterada y, preferiblemente actividad de Rb y/o p53 sustancialmente intacta/s, método que comprende administrar a un paciente mamífero en necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto representado por la

fórmula general I:



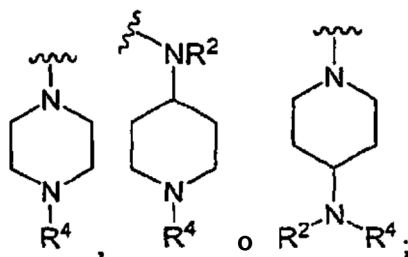
5 en la que:

$R^1$  se selecciona entre H, -Z-Q-Z, -alquil  $C_{1-8-N}(R^2)(R^4)$ , -alquil  $C_{1-8-OR^3}$ , resto carbocíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, arilo, heteroarilo y aralquilo  $C_{1-4}$ ;

10 cada  $R^2$  y  $R^4$  se selecciona independientemente para cada aparición entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo, heteroarilo, acilo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo, con la condición de que cuando ambos  $R^2$  y  $R^4$  estén en el mismo átomo de N y ninguno sea H, estos sean diferentes, y que cuando ambos  $R^2$  y  $R^4$  estén en el mismo N y bien  $R^2$  o  $R^4$  sea acilo, alquilsulfonilo o arilsulfonilo, entonces el otro se seleccione entre H, alquilo  $C_{1-8}$ , arilo, alquilo  $C_{1-4}$  y heteroarilo;

$R^3$  se selecciona entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo y heteroarilo;

15 W se selecciona entre



Q se selecciona entre O y  $NR^2$ ; y

20 Z se selecciona independientemente para cada aparición entre alquilo  $C_{1-6}$ , alqueno  $C_{2-6}$  y alquino  $C_{2-6}$ . Cuando Z es un grupo alqueno o alquino, el enlace o los enlaces dobles o triples, preferiblemente no están en el extremo del grupo.

25 En ciertas realizaciones, los compuestos de fórmula I no incluyen la erastina ni la erastina A.

30 Como es bien conocido en la técnica, la activación constitutiva de Ras parece ser un factor importante para el crecimiento maligno de las células cancerosas humanas. Las mutaciones de los proto-oncogenes RAS (H-RAS, N-RAS, K-RAS) son anomalías genéticas frecuentes que se encuentran en el 20% al 30% de todos los tumores humanos, aunque la incidencia en el tipo de tumor varía enormemente (Bos, *Cancer Res.* 49: 4682-4689, 1989). Las mayores tasas de mutaciones de RAS se detectaron en los adenocarcinomas de páncreas (90%), colon (50%) y pulmón (30%). En carcinomas foliculares y sin diferenciar de la tiroides, la incidencia de las mutaciones de RAS es también considerable (50%). Las mutaciones de RAS más comúnmente observadas surgen en sitios críticos para la regulación de Ras, concretamente, en los codones 12, 13 y 61. Cada una de estas mutaciones produce la supresión de la actividad GTPasa normal de Ras. La activación de Ras también se observa con frecuencia en tumores malignos hematológicos tales como leucemias mieloides y mielomas múltiples. En aproximadamente un tercio de los síndromes mielodisplásicos (SMD) y de las leucemias mieloides agudas (LMA), los genes RAS están activados mutacionalmente. Las mutaciones de RAS ocurren en aproximadamente el 40% de los pacientes recién diagnosticados de mieloma múltiple, y la frecuencia aumenta con la progresión de la enfermedad.

40 Por otra parte, los virus del polio infectan una amplia variedad de vertebrados (12 miembros conocidos actualmente). El virus del polio murino fue aislado por Ludwig Gross en 1953 mientras estudiaba la leucemia en ratones, y su nombre se debe a que causaba tumores sólidos en múltiples sitios. El segundo miembro de la familia, el virus vacuolizante de simio 40 (SV40) fue aislado por Sweet y Hilleman en 1960 en cultivos de células renales primarias de mono que se usaban para cultivar la vacuna OPV de tipo Sabin (Hilleman, *Dev. Biol. Stand* 94: 183-190, 1998). En 1971, se aislaron dos virus del polio humanos, el virus cBK (BKV) y el virus JC (JCV).

Los virus del poliovirus codifican tres proteínas implicadas en la transformación celular denominadas antígeno tumoral grande (LT), antígeno T mediano (mT) y antígeno tumoral pequeño (sT). Estas tres proteínas proceden del corte y empalme diferencial del transcrito de la región temprana y contienen secuencias homólogas. El antígeno T grande del poliovirus interactúa con la proteína supresora de tumores, pRb, y es capaz de inmortalizar fibroblastos primarios en cultivo. El dominio J de ADN ubicado en su extremo N-terminal, en particular, la secuencia HPDKYG encontrada entre los residuos 42 y 47, es fundamental para la desactivación funcional de proteínas de la familia Rb, como también ocurre con el antígeno T grande de SV40. La expresión de LT no es suficiente para producir un fenotipo celular transformado completamente; se necesita a mT, que es la principal proteína de transformación del virus del poliovirus. El antígeno T medio del poliovirus murino consiste en 421 aminoácidos y se puede dividir en al menos tres dominios, algunos de los cuales son compartidos con LT y sT. El dominio amino-terminal comprende los primeros 79 aminoácidos y también está presente en LT y sT. Adyacente al mismo, entre los residuos 80-192, hay un dominio que también está presente en el sT del poliovirus y contiene dos regiones ricas en cisteína, Cys-X-Cys-X-X-Cys, que también se han identificado en el antígeno T pequeño de SV40. La mutación de estas cisteínas suprime la capacidad de mT para transformar células. Los 229 aminoácidos restantes son únicos de mT y contienen el principal sitio de fosforilación de la tirosina del mT murino y una región hidrófoba (de aproximadamente 20 aminoácidos en el extremo carboxi-terminal) implicados en la localización de la membrana de esta proteína, que es necesaria para su actividad transformadora.

El antígeno T pequeño de SV40 comprende 174 aminoácidos. La región entre los residuos 97-103 interactúa con la proteína fosfatasa 2A (PP2A). Esta interacción reduce la capacidad de PP2A para desactivar las proteínas quinasas ERK1 y MEK1, produciendo la estimulación de la proliferación de células renales de mono quiescentes. Los ensayos dependientes del antígeno T pequeño también identificaron otras regiones que tenían la capacidad de mejorar la transformación celular. Estas regiones se encuentran en la parte N-terminal, que está compartida por los antígenos T grande y pequeño de SV40, y pueden funcionar como un dominio J de ADN. El antígeno T pequeño también se puede asociar con la tubulina y se ha sugerido que esto desempeña un papel en su función biológica.

Los solicitantes descubrieron que las células tanto con actividad de Ras activada como con expresión de antígeno T pequeño (y, por tanto, la actividad de la proteína diana del antígeno T pequeño disminuida, por ejemplo, PP2A disminuida, etc., o ERK1 y MEK1 aumentadas) pueden ser selectivamente destruidas por la erastina y sus análogos, probablemente a través de un mecanismo no apoptótico. En una realización preferida, la célula expresa un nivel sustancialmente de tipo natural de Rb y/o p53 (u otras dianas proteicas E6/E7).

Así pues, en ciertas realizaciones, las células cancerosas de ciertos genotipos específicos pueden ser selectivamente destruidas por los compuestos de la invención. Estos pueden incluir los cánceres que portan mutaciones de Ras constitutivamente activas o mutaciones de vías de señalización de Ras y actividad ERK1, MEK1 aumentada o actividad PP2A reducida.

En otras ciertas realizaciones, se puede modificar selectivamente el genotipo de las células diana (por ejemplo, para expresar el antígeno T pequeño de SV40, expresar ERK1 o MEK1, o inhibir la PP2A, etc.), de modo que las células diana que antes no eran susceptibles a la erastina y al análogo de erastina sean ahora susceptibles a tal destrucción.

Específicamente, se describe un método para destruir selectivamente células cancerosas que tienen actividad de Ras y expresión del antígeno T pequeño elevadas (o actividad de proteínas dirigidas al antígeno T pequeño alterada, tal como la actividad de PP2A, actividad de ERK1 o MEK1 aumentadas o un mecanismo que imita los efectos de sT, incluyendo, pero sin limitación, las mutaciones de la subunidad reguladora de PP2A), mientras se protegen las células relativamente normales que no tienen una actividad de Ras elevada, incluso cuando estas células también expresan el antígeno T pequeño. Esto puede ser útil, ya que muchos tipos de cáncer albergan la mutación RasV12 somática u otras mutaciones similares que conducen a una actividad de señalización de Ras elevada en células cancerosas, mientras que las células normales del mismo paciente/individuo, por lo general, no tienen las mismas mutaciones RasV12 u otras mutaciones de la vía de Ras. La erastina y sus análogos se pueden usar para destruir selectivamente estas células cancerosas, si las células cancerosas también expresan el antígeno T pequeño (o tienen la actividad de proteína dirigida al antígeno T pequeño alterada). Incluso aunque otras células normales del individuo/paciente también expresen el antígeno T pequeño, el presente método seguiría siendo eficaz en la destrucción de las células cancerosas, ya que es probable que las células normales no tengan actividad de señalización de Ras elevada. Incluso aunque el individuo no exprese el antígeno T pequeño, se puede administrar el antígeno T pequeño al paciente (bien como proteína o como ADN codificado en un vector) para conferir susceptibilidad a la muerte provocada por la erastina/análogo de erastina en células cancerosas (pero no normales).

Ya que se entiende que el antígeno T pequeño por sí mismo no es suficiente para inducir efectos adversos en el paciente, los efectos secundarios del tratamiento (que proporciona antígeno T pequeño al paciente) podrían ser mínimos o inexistentes. De hecho, se cree que nada menos que 30 millones de estadounidenses han estado expuestos al SV40 a través de las vacunaciones contra la polio realizadas entre 1955 y 1963. El SV40 encontró su camino en la vacuna a través de células renales de macacos usadas para cultivar el virus de la polio. Ese método ya no se usa y las vacunas contra la poliomielitis han estado libres del virus desde 1963. Los estudios de ADN realizados en la década de 1990 han encontrado SV40 en algunos tumores humanos. Sin embargo, la asociación

del ADN del virus con las células en división del tejido tumoral no prueba que el virus sea el causante de la formación del tumor. En octubre de 2002, un grupo de científicos del Instituto de Medicina de EE.UU. llegó a la conclusión de que no hay manera de determinar si el uso generalizado de la vacuna contra la polio contaminada con el virus SV40 de simio de hace décadas dio lugar a mayores tasas de cáncer en seres humanos.

5 En algunas realizaciones, la actividad de Ras elevada se manifiesta por una mutación de Ras constitutivamente activa (N-Ras, H-Ras o K-Ras) en las posiciones de los aminoácidos 12, 13 y/o 61.

10 En algunas otras realizaciones, la actividad de Ras elevada se manifiesta por una mayor actividad de uno o más componentes secuencia abajo de las proteínas de la vía de Ras, que incluyen pero sin limitación Raf, MEK, MAPK, etc.

15 En otras realizaciones más, la expresión del antígeno T pequeño se puede lograr mediante la infección de células diana con vectores tales como vectores adenovirales o retrovirales que expresan antígeno T pequeño de SV40 (véase más adelante).

20 Alternativamente, es posible proporcionar directamente el antígeno T pequeño a las células diana. Por ejemplo, el antígeno T pequeño se puede introducir en las células diana mediante diversos métodos conocidos en la técnica (véase más adelante). En una realización, el antígeno T pequeño se puede proporcionar a la célula diana atrapándolo en liposomas que portan cargas positivas en su superficie (por ejemplo, lipofectinas) y que están opcionalmente marcados con anticuerpos contra antígenos de la superficie celular del tejido diana, por ejemplo, anticuerpos contra un antígeno de la superficie de células cancerosas. En otra realización, el antígeno T pequeño se puede proporcionar a las células diana mediante transcitosis, usando cualquiera de los "péptidos de internalización" capaces de mediar este efecto, incluyendo, pero sin limitación, dominio N-terminal de la proteína Tat del VIH (por ejemplo, residuos 1-72 de Tat o un fragmento más pequeño de la misma que pueden potenciar la transcitosis), toda o una parte de la proteína de *Drosophila antenopedia* III, una parte suficiente de mastoparín, etc. (véase más adelante).

30 En otras realizaciones, la disminución de PP2A (y/o de otras proteínas diana del antígeno T pequeño) se puede lograr mediante la administración de un anticuerpo, ARNi (siARN, ARN de horquilla corta, etc.), la secuencia antisentido o inhibidor de moléculas pequeñas específico de tal proteína diana.

35 La administración de tales antagonistas de una proteína a una célula diana es muy conocida en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos WO04078940A2, EP1439227A1, WO04048545A2, US20040029275A1, WO03076592A2, WO04076674A1, WO9746671A1.

40 Otro aspecto de la invención proporciona un método terapéutico conjunto en el que se usa erastina/análogos de erastina y uno o más agentes o terapias (por ejemplo, radioterapia) que destruyen las células a través de un mecanismo apoptótico. Tales agentes incluyen muchos de los fármacos quimioterapéuticos descritos a continuación.

45 Se cree que ciertas proteínas tienen niveles de expresión elevados en células sensibles a la erastina. Una de tales proteínas, la VDAC3, se eleva a una abundancia 2-2,5 veces superior cuando se expone a la erastina, por ejemplo, y aunque los solicitantes no desean quedar vinculados a la teoría, se cree que su presencia o incluso su mayor abundancia es esencial para la destrucción mediada por la erastina.

Así pues, en otro aspecto de la invención, se proporciona un método para destruir o disminuir la tasa de proliferación de células que tienen un nivel elevado de una VDAC, tal como VDAC2 o VDAC3, que comprende poner en contacto las células diana con un análogo de erastina de acuerdo con lo definido en las reivindicaciones.

50 En ciertas realizaciones, las células diana se manipulan para expresar un nivel superior de una VDAC, tal como VDAC2 o VDAC3, para aumentar la susceptibilidad a la muerte o disminución de la tasa de proliferación mediada por la erastina y sus análogos funcionales.

55 Por ejemplo, se puede introducir una proteína VDAC en las células diana mediante diversos métodos conocidos en la técnica (véase más adelante). En una realización, la proteína VDAC se puede proporcionar a la célula diana atrapándola en liposomas que portan cargas positivas en su superficie (por ejemplo, lipofectinas) y que están opcionalmente marcados con anticuerpos contra antígenos de la superficie celular del tejido diana, por ejemplo, anticuerpos contra un antígeno de la superficie de células cancerosas. En otra realización, la proteína VDAC se puede proporcionar a las células diana mediante transcitosis, usando cualquiera de los "péptidos de internalización" capaces de mediar este efecto, incluyendo, pero sin limitación, dominio N-terminal de la proteína Tat del VIH (por ejemplo, residuos 1-72 de Tat o un fragmento más pequeño de la misma que pueden potenciar la transcitosis), toda o una parte de la proteína de *Drosophila antenopedia* III, una parte suficiente de mastoparín, etc. (véase más adelante).

65 Alternativamente, en tales células diana, se pueden introducir ácidos nucleicos que codifican una VDAC funcional con el uso, por ejemplo, de vectores adenovirales o retrovirales que expresen VDAC.

Además, es posible estimular la actividad de VDAC endógena (por ejemplo, VDAC3) con un agente que bien estimule la expresión de VDAC o suprima la actividad de un inhibidor de VDAC (inhibidor de la transcripción o de la traducción, o inhibidor que potencie la renovación de VDAC en la célula).

5 En ciertos aspectos, el método de la invención también implica la administración de un agente que aumente la abundancia de VDAC (por ejemplo, VDAC1, VDAC2, VDAC3) en la célula. El agente para aumentar la abundancia de VDAC puede, por ejemplo, incluir un polinucleótido que codifique VDAC, tal como VDAC3; puede ser una proteína VDAC (por ejemplo, VDAC3) adaptada a ser transportada en la célula, por ejemplo, fusionada con un dominio de internalización heterólogo o formulada en una preparación de liposomas.

10 En ciertos aspectos, el método de la invención también implica la administración de un agente que disminuya la abundancia de VDAC (por ejemplo, VDAC1, VDAC2, VDAC3) en la célula. El agente para disminuir la abundancia de VDAC puede, por ejemplo, inhibir la expresión de VDAC endógena (por ejemplo, VDAC3), suprimir la expresión de VDAC (por ejemplo, VDAC3) o aumentar la función de un inhibidor de VDAC (por ejemplo, VDAC3).

15 Los siguientes apartados describen ciertas realizaciones ejemplares de la invención, que se contemplan como capaces de combinarse entre sí. Además, las realizaciones son únicamente a efectos ilustrativos, y no se deberían interpretar como restrictivas en ningún aspecto.

## 20 Líneas celulares manipuladas genéticamente

En un aspecto, también se describen líneas celulares tumorigénicas manipuladas genéticamente.

25 Los informes anteriores han indicado que es posible convertir células humanas primarias en células tumorigénicas mediante la introducción de vectores que expresan las proteínas hTERT y Ras oncogénicas, así como otras que alteran la función de p53, RB y PP2A (Hahn *et al.*, 2002, *Mol Cell Biol.* 22, 2111-23; Hahn *et al.*, 1999, *Nature* 400, 464-8; Hahn y Weinberg, 2002, *Nat Rev Cancer* 2, 331-41; Lessnick *et al.*, 2002, *Cancer Cell* 1, 393-401). Los solicitantes hicieron uso de una serie de células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente y de sus precursores, que fueron creados mediante la introducción de determinados elementos genéticos en fibroblastos primarios de prepucio humano (Figura 1). Ya se ha publicado una variedad de características de estas células tumorigénicas manipuladas genéticamente, incluyendo su tiempo de duplicación, su resistencia a la senescencia replicativa y crisis en cultivo, su respuesta a la irradiación gamma, su capacidad para crecer de un modo independiente del anclaje y su capacidad para formar tumores en ratones inmunodeficientes (Hahn *et al.*, 1999, *supra*; Hahn *et al.*, 2002, *supra*; Lessnick *et al.*, 2002, *supra*).

35 En una serie de células manipuladas genéticamente, se introdujeron los siguientes elementos genéticos secuencialmente en fibroblastos BJ primarios: la subunidad catalítica humana de la enzima telomerasa (*hTERT*), una construcción genómica que codifica las oncoproteínas T grande (LT) y pequeña (ST) del virus de simio 40, y un alelo oncogénico de *HRAS* (*RAS<sup>V12</sup>*). Las líneas de células transformadas resultantes se nombraron, respectivamente: BJ-TERT, BJ-TERT/LT/ST y BJ-TERT/LT/ST/*RAS<sup>V12</sup>*. En una segunda serie, se crearon líneas celulares en las que se usaron construcciones de ADN complementario (ADNc) que codificaban LT y ST en lugar de la construcción genómica de SV40 que codifica ambas de estas proteínas virales. En esta última serie, ST se introdujo en la última etapa, permitiendo a los candidatos probar los compuestos en presencia o en ausencia de ST. Esta última línea celular tumorigénica humana manipulada genéticamente se denominó BJ-TERT/LT/*RAS<sup>V12</sup>*/ST.

45 En una tercera serie, se usaron líneas celulares derivadas de fibroblastos de prepucio humano TIP5 preparados de forma independiente creados mediante la introducción de construcciones de ADNc que codifican hTERT, LT, ST y *RAS<sup>V12</sup>* (Lessnick *et al.*, 2002, *Cancer Cell* 1, 393-401). Estas líneas celulares se denominaron, respectivamente: TIP5/TERT, TIP5/TERT/LT, TIP5/TERT/LT/ST y TIP5/TERT/LT/ST/*RAS<sup>V12</sup>*. En una cuarta serie, se usaron líneas celulares derivadas de fibroblastos TIP5 creados mediante la introducción de construcciones de ADNc que codifican hTERT, E6, E7, ST y *RAS<sup>V12</sup>*. Estas líneas celulares se denominaron, respectivamente: TIP5/TERT/E6, TIP5/TERT/E6/E7, TIP5/TERT/E6/E7/ST y TIP5/TERT/E6/E7/ST/*RAS<sup>V12</sup>*. En esta serie, E6 y E7 del VPH, que desactivan p53 y RB, respectivamente, tienen una función similar a LT en la serie anterior. Sin embargo, con el uso de E6 y E7 de VPH, los solicitantes pudieron observar los efectos de la desactivación, por separado y de forma independiente, de p53 y RB. Los resultados de un rastreo a gran escala para los compuestos que presentan la destrucción selectiva de estas líneas celulares tumorigénicas manipuladas genéticamente se describen en los siguientes ejemplos.

## 60 Métodos de rastreo de compuestos selectivos del genotipo

65 Se describen además rastreos a gran escala para los compuestos que presentan la destrucción selectiva de o la inhibición del crecimiento de (son selectivamente tóxicos para) líneas celulares tumorigénicas manipuladas genéticamente. Como se usa en la presente memoria, los términos agente y fármaco se usan indistintamente. Como se usa en la presente memoria, la expresión "es tóxico para" se refiere a la capacidad de un agente o compuesto para destruir o inhibir el crecimiento/proliferación de células tumorigénicas. Los rastreos a gran escala incluyen rastreos en los que se rastrean cientos o miles de compuestos en un formato de alto rendimiento en cuanto a la

toxicidad selectiva para las células tumorigénicas manipuladas genéticamente. En una realización, la toxicidad selectiva se determina mediante la comparación de la viabilidad celular de las células de ensayo, que son células tumorigénicas manipuladas genéticamente, y las células de control después del contacto con un agente candidato. Un control apropiado es una célula que sea del mismo tipo de célula que las células de ensayo, a excepción de que la célula de control no está manipulada genéticamente para ser tumorigénica. Por ejemplo, las células de control pueden ser las células primarias parentales de las que se obtienen las células de ensayo. Las células de control se ponen en contacto con el agente candidato en las mismas condiciones que las células de ensayo. Se puede procesar un control apropiado de forma simultánea o puede estar preestablecido (por ejemplo, una referencia o un patrón preestablecido). En ciertas realizaciones, el agente candidato se selecciona de una biblioteca de compuestos, tal como una biblioteca combinatoria. La viabilidad celular se puede determinar mediante cualquiera de una variedad de medios conocidos en la técnica, incluyendo el uso de colorantes tales como acetoximetiléster de calceína (AM de calceína) y azul Alamar. En ciertas realizaciones, se aplica un colorante tal como AM de calceína para probar y controlar las células después del tratamiento con un agente candidato. En las células vivas, el AM de calceína es escindido por las esterasas intracelulares, formando el derivado aniónico de calceína fluorescente, que no puede difundirse fuera de las células vivas. Por lo tanto, las células vivas muestran una fluorescencia verde cuando se incuban con AM de calceína, mientras que las células muertas no lo hacen. La fluorescencia verde mostrada por las células vivas se puede detectar y, por lo tanto, puede proporcionar una medida de la viabilidad celular.

En ciertas realizaciones, un agente que haya sido identificado como uno que induce selectivamente la muerte celular en una célula tumorigénica manipulada genéticamente se caracteriza además en un modelo animal. Los modelos animales incluyen ratones, ratas, conejos y monos, que pueden ser no transgénicos (por ejemplo, de tipo natural) o animales transgénicos. El efecto del agente que induce selectivamente la muerte celular en células tumorigénicas manipuladas genéticamente se puede evaluar en un modelo animal para cualquier número de efectos tales como su capacidad para inducir selectivamente la muerte celular en las células tumorigénicas del animal y su toxicidad general para el animal. Por ejemplo, el método puede comprender además la evaluación de la toxicidad selectiva de un agente (fármaco) para las células tumorigénicas en un modelo murino apropiado.

El efecto del agente que induce la muerte de las células tumorigénicas manipuladas genéticamente en un modelo animal se puede evaluar para cualquier número de efectos tales como su capacidad para inducir la muerte de células tumorigénicas en el animal y su toxicidad general para el animal. Por ejemplo, el método puede comprender además la evaluación de la toxicidad de un agente (fármaco) para las células tumorigénicas en un modelo murino apropiado. A efectos ilustrativos, se puede evaluar además un agente mediante el uso de un ensayo de crecimiento tumoral que evalúe la capacidad del agente analizado para inhibir el crecimiento de tumores sólidos establecidos en ratones. El ensayo se puede realizar mediante la implantación de células tumorales en las bolsas de grasa de ratones atímicos. A continuación, se dejan crecer las células tumorales hasta un tamaño determinado antes de administrar los agentes. Se hace un seguimiento del volumen de los tumores durante un número de semanas, por ejemplo, tres semanas. Durante el ensayo, también se hace un seguimiento de la salud general de los animales sometidos al mismo.

En realizaciones adicionales, un agente que se haya identificado como un agente que destruye o inhibe selectivamente el crecimiento/la proliferación de células tumorigénicas manipuladas genéticamente se caracteriza además en ensayos basados en células para evaluar su mecanismo de acción. Por ejemplo, el agente se puede analizar en ensayos de apoptosis para evaluar su capacidad para inducir la muerte celular por medio de una vía proapoptótica. En otras realizaciones, se evalúa un agente que induce la muerte de las células tumorales en cuanto a su capacidad para inducir la muerte de células tumorigénicas por una vía no apoptótica. Por ejemplo, el agente se puede analizar en ensayos de apoptosis para evaluar su incapacidad para inducir la muerte celular por medio de una vía proapoptótica.

También se describe un método para la identificación de agentes (fármacos) que suprimen selectivamente la toxicidad celular en células manipuladas genéticamente. Una realización se refiere a un método para identificar un agente (un fármaco) que suprima la toxicidad celular que comprende poner en contacto células de ensayo con un agente candidato; determinar la viabilidad de las células de ensayo puestas en contacto con el agente candidato; y comparar la viabilidad de las células de ensayo con la viabilidad de un control apropiado. Si la viabilidad de las células de ensayo es superior a la de las células de control, entonces se identifica un agente (un fármaco) que suprime selectivamente la toxicidad celular. Un control apropiado es una célula que es del mismo tipo de célula que las células de ensayo, a excepción de que la célula de control no está manipulada genéticamente para expresar una proteína que produzca toxicidad. Por ejemplo, las células de control pueden ser las células primarias parentales de las que se han obtenida las células de ensayo. Las células de control se ponen en contacto con el agente candidato en las mismas condiciones que las células de ensayo. Se puede procesar un control apropiado de forma simultánea o puede estar preestablecido (por ejemplo, una referencia o un patrón preestablecido).

En ciertas realizaciones, los compuestos selectivos del genotipo (agentes antitumorales) pueden ser cualquier producto químico (elemento, molécula, compuesto, fármaco), ya sea fabricado sintéticamente mediante técnicas recombinantes o aislado de una fuente natural. Por ejemplo, estos compuestos pueden ser péptidos, polipéptidos, peptoides, azúcares, hormonas o moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico antisentido o de ARNi). Además, estos compuestos pueden ser moléculas pequeñas o moléculas de mayor complejidad

creadas mediante química combinatoria, por ejemplo, compiladas en bibliotecas. Estas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. Estos compuestos también pueden ser naturales o productos manipulados genéticamente aislados de lisados o medios de cultivo de células - bacterianas, animales o vegetales - o pueden ser los propios

5 lisados de células o medios de cultivo. La presentación de estos compuestos a un sistema de ensayo puede estar bien en una forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas iniciales de rastreo.

### Compuestos selectivos del genotipo de la invención

10 Los resultados de los solicitantes demuestran que es posible identificar compuestos con una mayor potencia y actividad en presencia de determinados elementos genéticos. Aunque los informes anteriores indican que puede ser posible identificar tales compuestos selectivos del genotipo en el caso de un elemento genético de interés (Simons *et al.*, 2001, *Genome Res* 11, 266-73; Stockwell *et al.*, 1999, *Chem. Biol.* 6, 71-83; Torrance *et al.*, 2001, *Nat Biotechnol* 19, 940-5), el trabajo descrito en la presente memoria proporciona una prueba sistemática de la letalidad

15 sintética con el uso de más de 23.000 compuestos y uno o más elementos genéticos relacionados con el cáncer.

Los nueve compuestos selectivos identificados ayudan a definir las consecuencias de la introducción de TERT y una o más entre LT, ST, E6, E7 y RAS oncogénica en células humanas normales. Uno de los efectos de estos cambios genéticos es aumentar la tasa de proliferación celular y permitir la sensibilidad hacia moléculas pequeñas que

20 inhiben la síntesis del ADN. Aunque está bien establecido que tales agentes, preferentemente, se dirigen con rapidez hacia las células tumorales replicantes, es reconfortante ver que este principio surge de este criterio de rastreo imparcial. Además, la metodología hizo posible distinguir fácilmente entre los compuestos que tienen una base clara para la selectividad genética y aquellos que no la tienen.

25 Los resultados mostraron que la expresión de hTERT y bien de E7 o de LT sensibiliza a las células hacia los venenos de la topoisomerasa II. Dado que la pérdida o desactivación de RB (Sellers y Kaelin, 1997, *J. Clin Oncol* 15, 3301-12; Sherr, 2001, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 731-7) y la activación de la telomerasa (Hahn y Weinberg, 2002, *Nat Rev Cancer* 2, 331-41; Harley, 1994, *Pathol Biol* (Paris) 42, 342-5) se encuentran en la mayoría de cánceres humanos, estas observaciones pueden explicar, en parte, la actividad de estos agentes en una amplia selección de

30 tipos de tumores humanos.

Los solicitantes descubrieron que la camptotecina es selectivamente letal para las células que albergan tanto ST como RAS oncogénica, debido al efecto combinado de estos dos genes en la expresión de la topoisomerasa I. Las células tumorales que se dividen rápidamente usan la topoisomerasa I para desenredar el ADN superenrollado con el fin de efectuar la división celular de manera continua y rápida. Cuando se modifican simultáneamente estas dos

35 vías, la topoisomerasa I se sobrerregula, quizás indirectamente, y tales células tumorales se vuelven sensibles a los venenos de la topoisomerasa I.

Estas observaciones sugieren que un aspecto de la capacidad de ST para transformar células humanas junto con RAS<sup>V12</sup>, LT y hTERT puede ser el efecto de ST y RAS<sup>V12</sup> en la expresión de la topoisomerasa I. Se han descrito mutaciones en *HRAS* y *KRAS* en muchos tipos de cánceres humanos. Además, la desactivación de *PPP2R1B*, un componente de PP2A, se ha descrito recientemente en los tumores de colon y pulmón (Wang *et al.*, 1998, *Science* 282, 284-7), mientras que las mutaciones en una subunidad de PP2A diferente se han descrito en el melanoma, y los cánceres de pulmón, mama y colon (Calin *et al.*, 2000, *Oncogene* 19, 1191-5; Kohno *et al.*, 1999, *Cancer Res* 59, 4170-4; Ruediger *et al.*, 2001, *Oncogene* 20, 1892-9; Ruediger *et al.*, 2001, *Oncogene* 20, 10-5). En la actualidad, no está claro si la alteración simultánea de estas dos vías se produce en alta frecuencia en tumores humanos o si los cánceres en los que ambas de estas vías están perturbadas muestran una mayor susceptibilidad a estos

40 compuestos.

Además, los solicitantes identificaron un nuevo compuesto, denominado erastina (véase la Figura 8), que es letal para las células que expresan tanto ST como RAS<sup>V12</sup>. El tratamiento de las células con este compuesto no pudo destruir las células que carecían de RAS<sup>V12</sup> y ST, incluso usándolo a concentraciones ocho veces superiores a la necesaria para observar un efecto en células que expresan tanto RAS<sup>V12</sup> como ST, lo que indica un grado de especificidad. El efecto letal de la erastina es rápido e irreversible una vez obtenido.

50 La erastina se puede usar para inducir la muerte celular en cualquier célula tumoral en la que el contacto de la célula tumoral con la erastina produzca la muerte celular. Las células tumorigénicas en las que se puede producir la letalidad mediante la actividad de la erastina no solo incluyen las células tumorigénicas manipuladas genéticamente, tales como las células manipuladas genéticamente que expresan tanto ST como RAS<sup>V12</sup>, sino también las células tumorigénicas que comprenden un vía de RAS activada independiente de la expresión de ST y RAS<sup>V12</sup>.

60

Los solicitantes analizaron además la actividad y la selectividad en células tumorales frente a las células normales de 135 análogos de erastina. 134 de estos análogos fueron inactivos. Uno fue activo y selectivo, pero menos potente que la erastina. Este compuesto se denominó erastina B (véase la Figura 8). En ciertas realizaciones de la invención, la invención se refiere al compuesto, la erastina. En realizaciones adicionales, la invención se refiere a análogos del compuesto, erastina, cuyos análogos presentan una toxicidad selectiva para células tumorigénicas

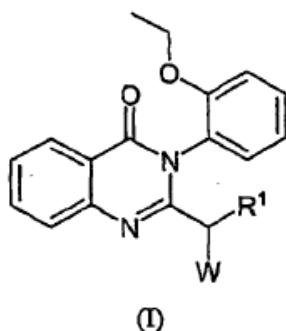
65



manipuladas genéticamente tales como células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente. En una realización, el análogo de erastina, que presenta toxicidad selectiva para células tumorigénicas humanas manipuladas genéticamente, es la erastina B. En ciertas realizaciones, la invención se refiere a una mezcla racémica de un compuesto de la invención, cuya mezcla presenta toxicidad selectiva para células tumorigénicas manipuladas genéticamente.

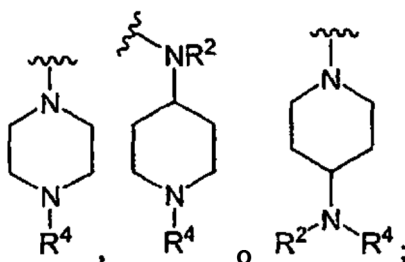
Tanto para la camptotecina (CPT) como para la erastina, los solicitantes identificaron sinergia entre las vías modificadas por la expresión de RAS<sup>V12</sup> y ST. La expresión de RAS<sup>V12</sup> conduce a la activación de varias vías de señalización bien caracterizadas, incluyendo la cascada de señalización de RAF-MEK-MAPK, la vía de señalización de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la vía del factor de disociación de Ral-guanina (Ral-GDS). Cada una de estas vías se ha implicado en cánceres humanos, y el trabajo reciente demuestra que estas vías funcionan conjuntamente en este sistema de transformación celular (Hamad *et al.*, 2002, *Genes Dev* 16,2045-57). Además, ST se une a y desactiva la PP2A, una serina-treonina fosfatasa ampliamente expresada. Aunque todavía se desconocen las dianas enzimáticas específicas de PP2A que son perturbadas tras la expresión de TS, hay un solapamiento sustancial entre las vías modificadas por PP2A y RAS (Millward *et al.*, 1999, *Trends Biochem Sci* 24, 186-91). La mejor comprensión del mecanismo mediante el cual la erastina induce la destrucción de las células que albergan alteraciones de estas dos vías de señalización puede proporcionar pistas sobre la naturaleza y el grado del solapamiento funcional entre estas dos vías.

Los análogos de erastina distintos de la erastina B y la erastina A se representan mediante la fórmula general I:



en la que

R<sup>1</sup> se selecciona entre H, -Z-Q-Z, -alquil C<sub>1-8</sub>-N(R<sup>2</sup>)(R<sup>4</sup>), -alquil C<sub>1-8</sub>-OR<sup>3</sup>, resto carbocíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, arilo, heteroarilo y alquilo C<sub>1-4</sub>;  
 cada R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> se selecciona independientemente para cada aparición entre H, alquilo C<sub>1-4</sub>, aralquilo C<sub>1-4</sub>, arilo, heteroarilo, acilo, alquilsulfonylo y arilsulfonylo, con la condición de que cuando ambos R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> estén en el mismo N y bien R<sup>2</sup> o R<sup>4</sup> sea acilo, alquilsulfonylo o arilsulfonylo, entonces el otro se seleccione entre H, alquilo C<sub>1-8</sub>, arilo, alquilo C<sub>1-4</sub> y heteroarilo;  
 R<sup>3</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1-4</sub>, aralquilo C<sub>1-4</sub>, arilo y heteroarilo;  
 W se selecciona entre

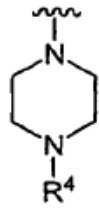


Q se selecciona entre O y NR<sup>2</sup>; y  
 Z se selecciona independientemente para cada aparición entre alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> y alquino C<sub>2-6</sub>. Cuando Z es un grupo alqueno C<sub>2-6</sub> o alquino C<sub>2-6</sub>, el enlace o los enlaces dobles o triples, preferiblemente, no están en el extremo del grupo. Los compuestos englobados por las reivindicaciones son análogos de erastina de acuerdo con la invención.

En ciertas realizaciones preferidas cuando ambos R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> están en el mismo átomo de N, bien ambos son H o son diferentes.

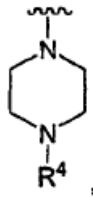
En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> es H.

En ciertas realizaciones, W es



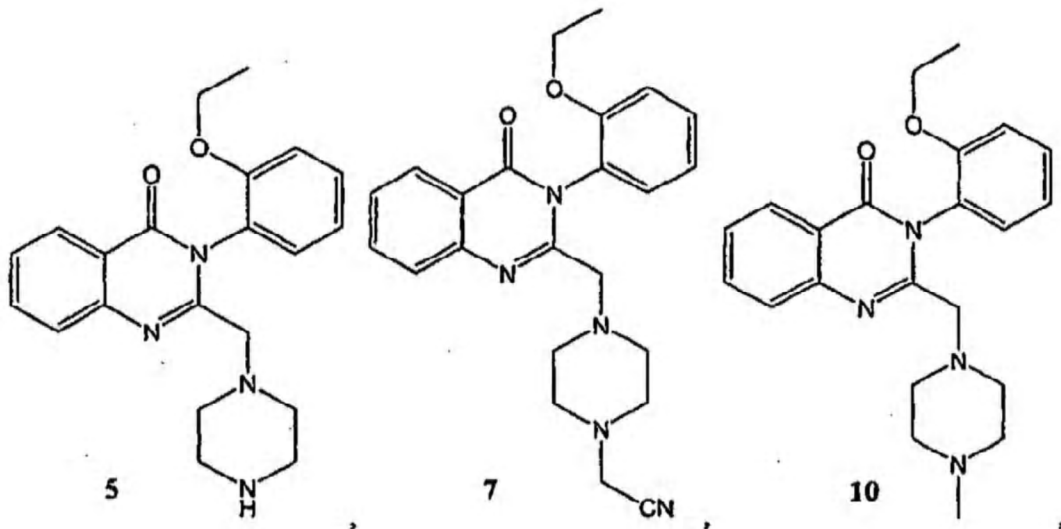
5 En ciertas realizaciones, R<sup>4</sup> se selecciona entre H, o alquilo inferior sustituido o no sustituido.

En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> es H, W es

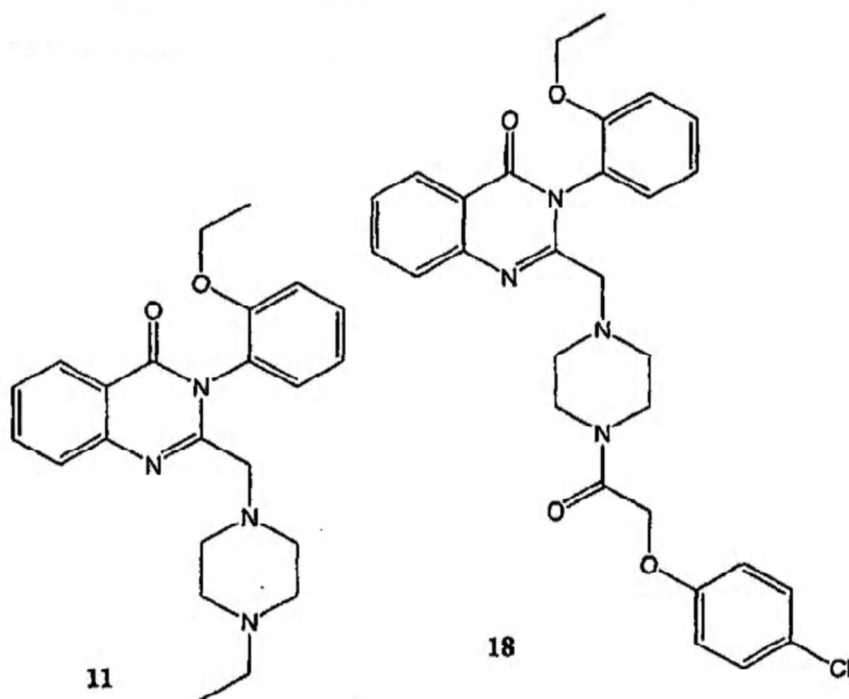


10 y R<sup>4</sup> se selecciona entre H o alquilo inferior sustituido o no sustituido.

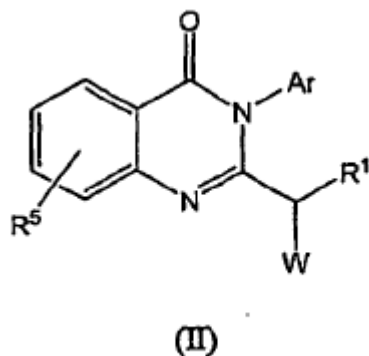
Los compuestos ejemplares de fórmula I incluyen:



de acuerdo con la invención

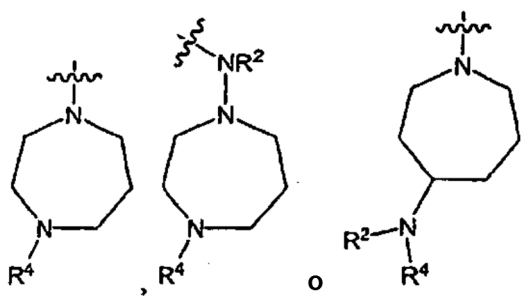


Otros análogos de erastina adicionales se representan mediante la fórmula general II:



5 en la que

- 10 Ar es un fenilo sustituido;  
 R<sup>1</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1-8</sub>, -Z-Q-Z, -alquil C<sub>1-8</sub>-N(R<sup>2</sup>)(R<sup>4</sup>), -alquil C<sub>1-8</sub>-OR<sup>3</sup>, resto carbocíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, arilo, heteroarilo y aralquilo C<sub>1-4</sub>;  
 cada R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> se selecciona independientemente para cada aparición entre H, alquilo C<sub>1-4</sub>, aralquilo C<sub>1-4</sub>, arilo, heteroarilo, acilo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo, con la condición de que cuando ambos R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> estén en el mismo N y bien R<sup>2</sup> o R<sup>4</sup> sea acilo, alquilsulfonilo o arilsulfonilo, entonces el otro se seleccione entre H, alquilo C<sub>1-8</sub>, arilo, aralquilo C<sub>1-4</sub>, arilo y heteroarilo;  
 15 R<sup>3</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1-4</sub>, aralquilo C<sub>1-4</sub>, arilo y heteroarilo;  
 R<sup>5</sup> representa 0-4 sustituyentes en el anillo al que está unido;  
 W es



Q se selecciona entre O y NR<sup>2</sup>; y

Z se selecciona independientemente para cada aparición entre alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> y alquino C<sub>2-6</sub>.  
 5 Cuando Z es un grupo alqueno o alquino, el enlace o los enlaces dobles o triples, preferiblemente, no están en el extremo del grupo.

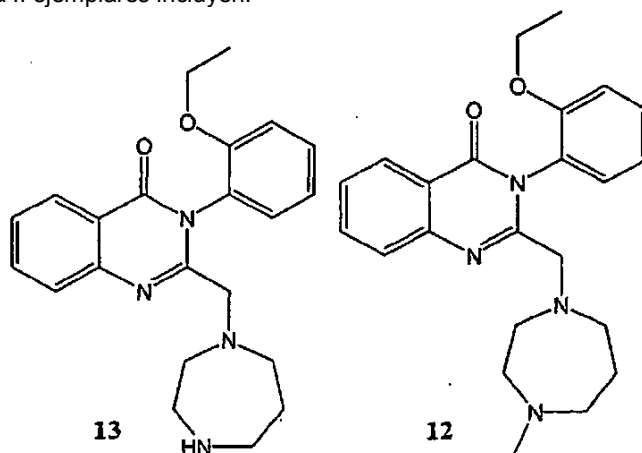
En ciertas realizaciones, R<sup>5</sup> representa 1-4 sustituyentes tales como halógeno o nitro. En ciertas realizaciones R<sup>5</sup> representa un sustituyente tal como halógeno o nitro, especialmente cloro, situado *para* con respecto al carbonilo del anillo quinazolinona. En otras realizaciones, R<sub>5</sub> no representa sustituyentes en el anillo (es decir, todos los sustituyentes son átomo de hidrógeno).  
 10

En ciertas realizaciones, Ar está monosustituido, en el que el sustituyente es halógeno, alcoxilo inferior o alquilo inferior. En ciertas realizaciones, Ar está sustituido en la posición *orto*, en la que el sustituyente es halógeno, alcoxilo inferior o alquilo inferior. En ciertas realizaciones, Ar está 2,6-disustituido, de modo que un sustituyente es halógeno, alcoxilo inferior o alquilo inferior y el segundo sustituyente es halógeno, alcoxilo inferior o alquilo inferior.  
 15

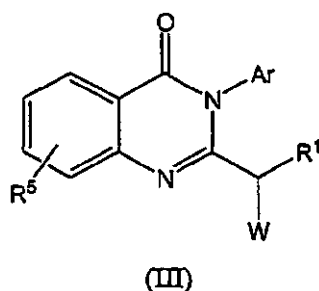
En ciertas realizaciones, los compuestos de fórmula II no incluyen aquellos en los que el sustituyente de Ar es etoxilo en una posición *orto* con respecto al enlace con el nitrógeno del anillo quinazolinona. En otras realizaciones, los compuestos de fórmula II no incluyen aquellos en los que Ar no tiene un sustituyente de alcoxilo inferior o alquilo inferior *orto* con respecto al enlace con el nitrógeno del anillo quinazolinona.  
 20

En ciertas realizaciones del compuesto de fórmula II, Ar tiene al menos un sustituyente halógeno. En ciertas realizaciones, Ar tiene un sustituyente halógeno en la posición *orto*. En realizaciones preferidas, los compuestos de fórmula II incluyen aquellos en los que Ar es un anillo 2,6-disustituido en el que los sustituyentes son átomos de halógeno.  
 25

Los compuestos de fórmula II ejemplares incluyen:



30 Otros análogos de erastina adicionales se representan mediante la fórmula general III:



en la que

Ar es un fenilo sustituido o no sustituido;

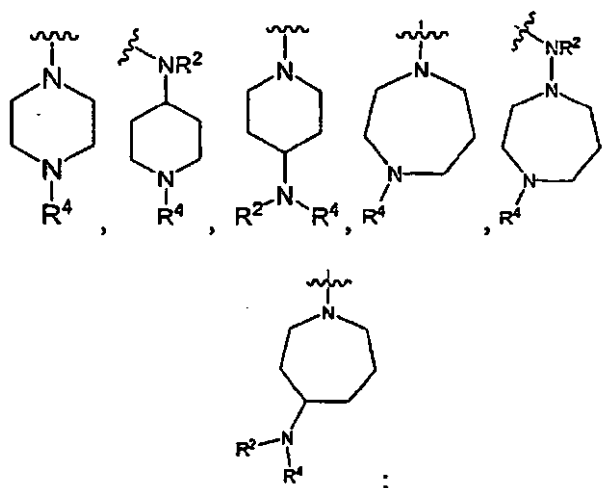
R<sup>1</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1-8</sub>, -Z-Q-Z, -alquil C<sub>1-8</sub>-N(R<sup>2</sup>)(R<sup>4</sup>), -alquil C<sub>1-8</sub>-OR<sup>3</sup>, resto carbocíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, arilo, heteroarilo y aralquilo C<sub>1-4</sub>;

cada R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> se selecciona independientemente para cada aparición entre H, alquilo C<sub>1-4</sub>, aralquilo C<sub>1-4</sub>, arilo, heteroarilo, acilo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo, con la condición de que cuando ambos R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> estén en el mismo átomo de N y bien R<sup>2</sup> o R<sup>4</sup> sea acilo, alquilsulfonilo o arilsulfonilo, entonces el otro se seleccione entre H, alquilo C<sub>1-8</sub>, arilo, aralquilo C<sub>1-4</sub> y heteroarilo;

R<sup>3</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1-4</sub>, aralquilo C<sub>1-4</sub>, arilo y heteroarilo;

R<sup>5</sup> representa 0-4 sustituyentes en el anillo al que está unido;

W se selecciona entre



Q se selecciona entre O y NR<sup>2</sup>; y

Z se selecciona independientemente para cada aparición entre alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> y alquino C<sub>2-6</sub>. Cuando Z es un grupo alqueno o alquino, el enlace o los enlaces dobles o triples, preferiblemente, no están en el extremo del grupo.

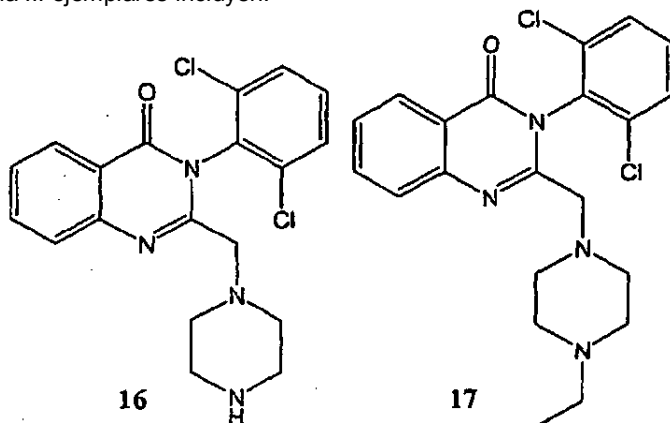
En ciertas realizaciones, R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> bien ambos son H o son diferentes.

En ciertas realizaciones, R<sup>5</sup> representa de 1-4 sustituyentes en el anillo al que está unido tales como halógeno o nitro. En ciertas realizaciones R<sub>5</sub> representa un sustituyente tal como halógeno o nitro, especialmente cloro, situado *para* con respecto al carbonilo del anillo quinazolinona. En otras realizaciones, R<sup>5</sup> representa sustituyentes en el anillo (es decir, todos los sustituyentes son átomos de hidrógeno).

En ciertas realizaciones, los compuestos de fórmula III no incluyen aquellos en los que el sustituyente de Ar es etoxilo en una posición *orto* con respecto al enlace con el nitrógeno del anillo quinazolinona. En otras realizaciones, los compuestos de fórmula III no incluyen aquellos en los que Ar no tiene un sustituyente de alcoxilo inferior o alquilo inferior *orto* con respecto al enlace con el nitrógeno del anillo quinazolinona.

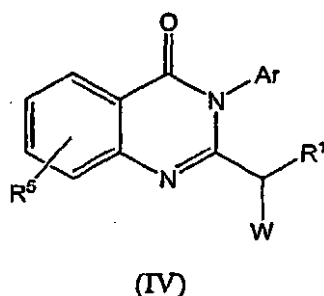
En realizaciones preferidas de la presente invención, Ar es un fenilo sustituido. En ciertas realizaciones de los compuestos de fórmula III, Ar tiene al menos un sustituyente de halógeno. En ciertas realizaciones, Ar tiene un sustituyente de halógeno en la posición *orto*. En realizaciones preferidas, los compuestos de fórmula III incluyen aquellos en los que Ar es un anillo fenilo 2,6-disustituido en el que los sustituyentes son átomos de halógeno.

Los compuestos de fórmula III ejemplares incluyen:



5

Otros análogos de erastina adicionales se representan mediante la fórmula general IV:

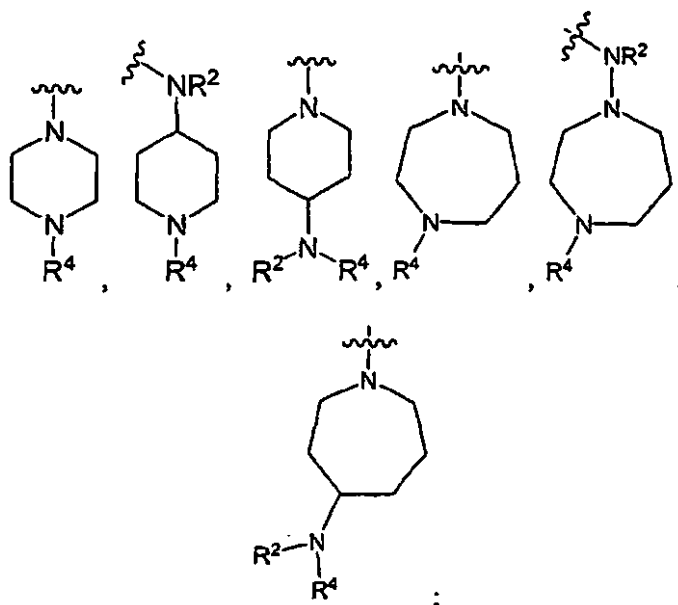


en la que

10

Ar es fenilo sustituido o no sustituido;  
 R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>1-8</sub>;  
 cada R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> se selecciona independientemente para cada aparición entre H y alquilo C<sub>1-8</sub>;  
 R<sup>5</sup> representa 0-4 sustituyentes en el anillo al que está unido;  
 W se selecciona entre

15



20

y  
 Q se selecciona entre O y NR<sup>2</sup>.

En ciertas realizaciones, R<sup>5</sup> representa de 1-4 sustituyentes en el anillo al que está unido tales como halógeno o nitro. En ciertas realizaciones, R<sub>5</sub> representa un sustituyente tal como halógeno o nitro, especialmente cloro, situado *para* con respecto al carbonilo del anillo quinazolinona. En otras realizaciones, R<sub>5</sub> no representa sustituyentes en el

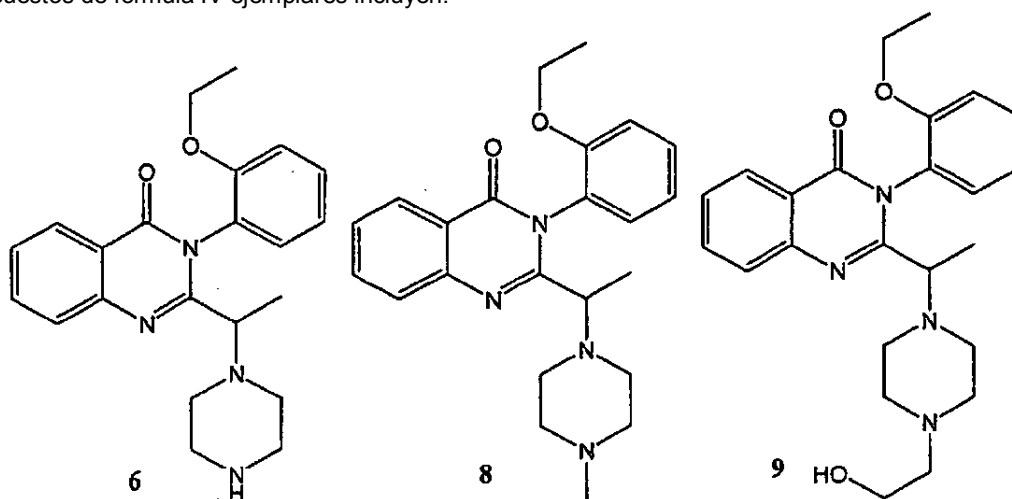
anillo (es decir, todos los sustituyentes son átomo de hidrógeno).

En realizaciones preferidas, Ar es un fenilo sustituido. En ciertas realizaciones, Ar está monosustituido, en el que el sustituyente es halógeno, alcoxilo inferior o alquilo inferior. En ciertas realizaciones, Ar tiene un sustituyente en la posición *orto*, en el que el sustituyente es halógeno, alcoxilo inferior o alquilo inferior. En ciertas realizaciones, Ar está 2,6-disustituido, de modo que un sustituyente es halógeno, alcoxilo inferior o alquilo inferior y el segundo sustituyente es halógeno, alcoxilo inferior o alquilo inferior.

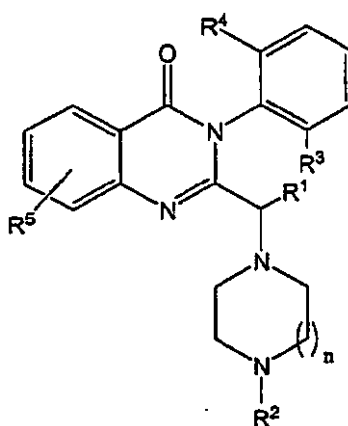
En ciertas realizaciones, los compuestos de fórmula IV no incluyen aquellos en los que el sustituyente de Ar es etoxilo en una posición *orto* con respecto al enlace con el nitrógeno del anillo quinazolinona. En otras realizaciones, los compuestos de fórmula IV no incluyen aquellos en los que Ar no tiene un sustituyente de alcoxilo inferior o alquilo inferior *orto* con respecto al enlace con el nitrógeno del anillo quinazolinona.

En ciertas realizaciones de los compuestos de fórmula IV, Ar tiene al menos un sustituyente halógeno. En ciertas realizaciones, Ar tiene un sustituyente halógeno en la posición *orto*. En realizaciones preferidas, los compuestos de fórmula IV incluyen aquellos en los que Ar es un anillo fenilo 2,6-disustituido en el que los sustituyentes son átomos de halógeno.

Los compuestos de fórmula IV ejemplares incluyen:



Otros análogos de erastina adicionales se representan mediante la fórmula general V:

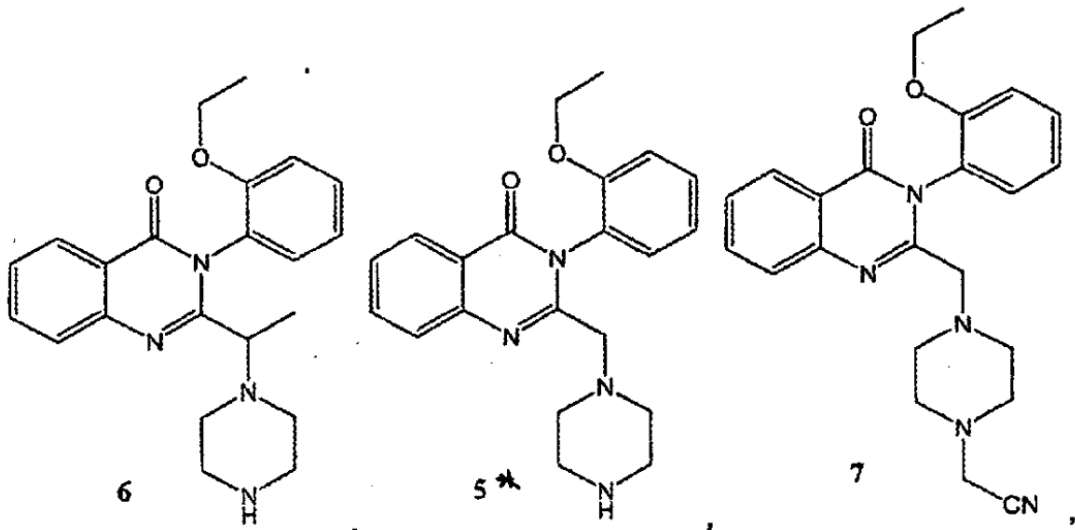


en la que

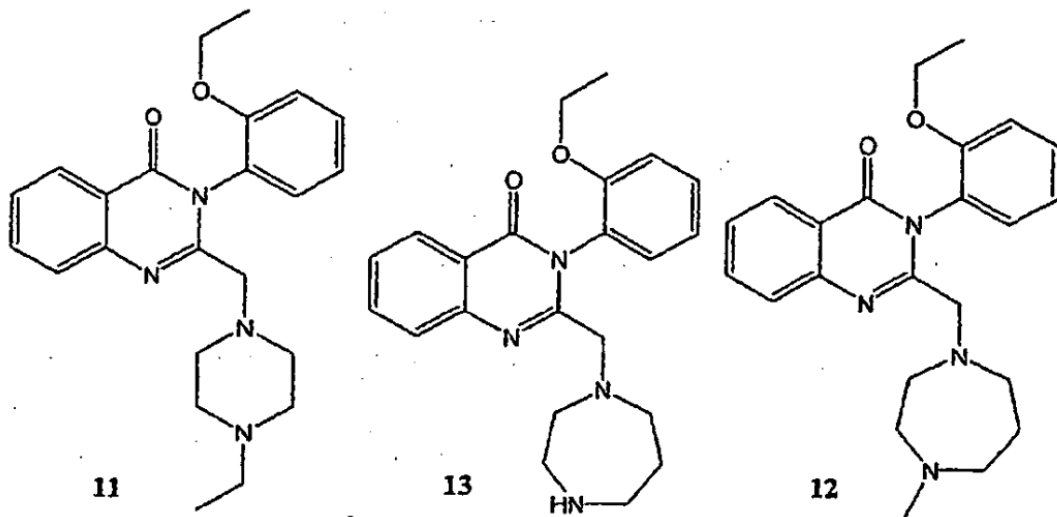
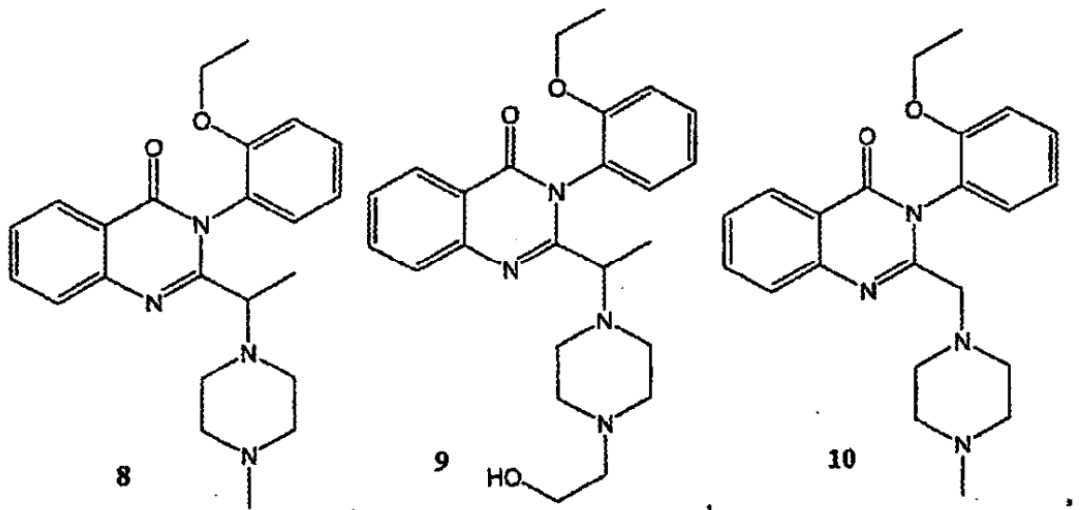
- R<sup>1</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1-8</sub>;
- R<sup>2</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1-8</sub>;
- R<sup>3</sup> se selecciona entre halógeno, alcoxilo C<sub>1-8</sub> y alquilo C<sub>1-8</sub>;
- R<sup>4</sup> se selecciona entre H, halógeno, alcoxilo C<sub>1-8</sub> y alquilo C<sub>1-8</sub>;
- R<sup>5</sup> se selecciona entre H, halógeno y nitro; y
- n es 1 o 2.

Los compuestos de fórmula V ejemplares incluyen:

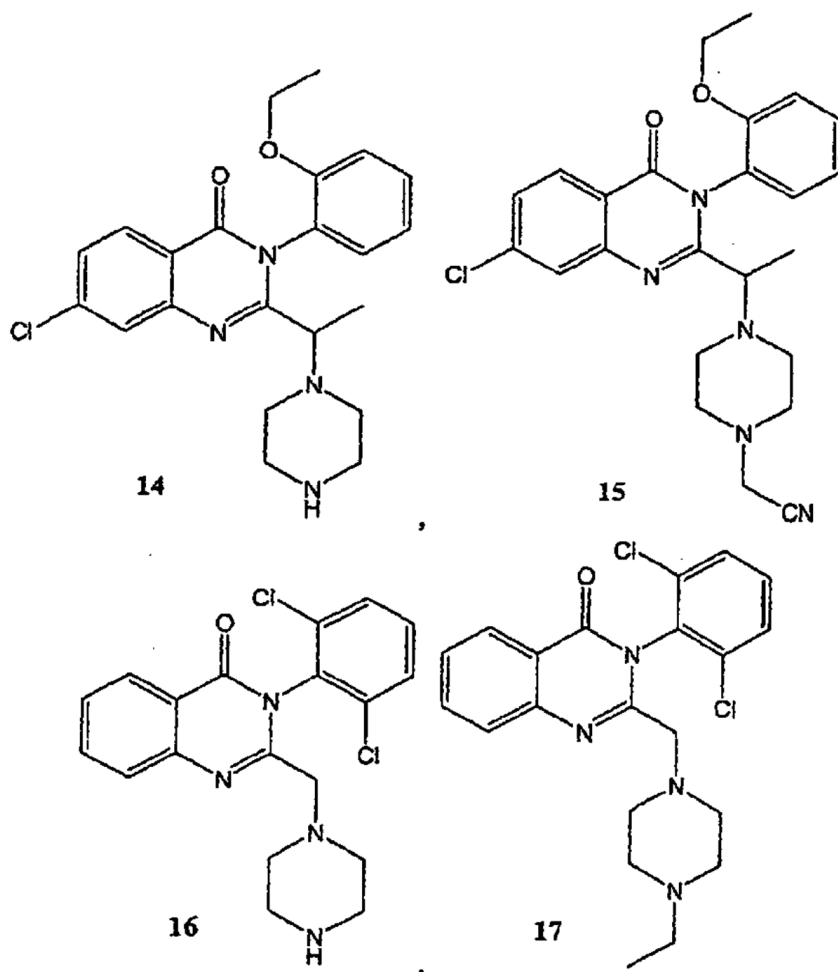
wo:



de acuerdo con la invención







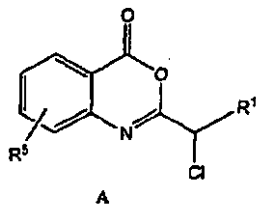
Cualquiera de los compuestos de fórmulas I-V se puede usar para cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para la erastina y los análogos de erastina.

5 Los compuestos incluidos en la invención incluyen enantiómeros y diastereoisómeros de los compuestos divulgados en la presente memoria. La invención también incluye sales, particularmente sales farmacéuticamente aceptables, de los compuestos divulgados en la presente memoria. Además, la invención incluye solvatos, hidratos y formas polimórfas cristalinas de los compuestos divulgados en la presente memoria.

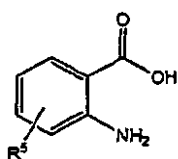
10 Los agentes adecuados pueden tener la actividad citada en la forma existente, o tras un metabolismo completo o parcial.

También se proporciona la síntesis o la fabricación de un compuesto de la invención.

15 Se describe la preparación de un compuesto A:

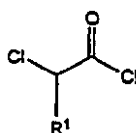


20 en el que R<sup>5</sup> y R<sup>1</sup> son como se describen para las estructuras II-V. En ciertas realizaciones una etapa de la síntesis del compuesto A es la reacción de un compuesto B,



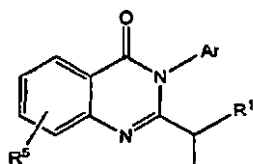
B

con un compuesto C,



C

- 5 En ciertas realizaciones, la reacción del compuesto B con el compuesto C se realiza en un disolvente polar aprótico tal como acetonitrilo, DMSO, éter dietílico, butanona, ciclohexanona, acetofenona, tetrahydrofurano, acetona, diclorometano, sulfolano o dimetilformamida. En realizaciones preferidas, el disolvente es dimetilformamida o diclorometano. En ciertas realizaciones, la reacción se realiza bajo una atmósfera de nitrógeno. En ciertas realizaciones, se añade una base orgánica, tal como piridina, diisopropilamina, 2,6-lutidina, trialkilaminas (por ejemplo, trietilamina), pirrolidina, piperidina o imidazol, a una solución del compuesto B seguida de la adición del compuesto C a la solución resultante. En realizaciones preferidas, la base orgánica es una base de amina tal como una trialkilamina, tal como trietilamina. En realizaciones preferidas, la reacción se realiza en un intervalo de 0-10 °C.
- 15 También se proporciona la preparación de un compuesto de estructura D,



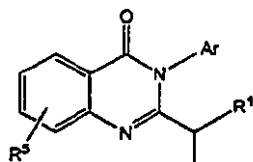
D

en la que R<sup>5</sup>, R<sup>1</sup> y Ar son como se describen para las estructuras II-V. En ciertas realizaciones, una etapa de la síntesis de D es la reacción de un compuesto A con el compuesto E, Ar-NH<sub>2</sub>.

- 20 En ciertas realizaciones, la reacción del compuesto A con el compuesto E se realiza en un disolvente polar aprótico tal como acetonitrilo, DMSO, éter dietílico, butanona, ciclohexanona, acetofenona, tetrahydrofurano, acetona, diclorometano, sulfolano o dimetilformamida. En realizaciones preferidas, el disolvente es acetonitrilo. En ciertas realizaciones, la reacción se realiza bajo una atmósfera de nitrógeno. En ciertas realizaciones, la reacción se realiza en presencia de triclorofosfina. En ciertas realizaciones, la reacción se mantiene en un intervalo de 40-60 °C durante un período de tiempo tal como de 5-15 horas. En otras realizaciones, se añade tricloruro de fosforilo a la solución agitada de A y E, y se calienta a reflujo la mezcla resultante durante un período de tiempo tal como de 1-5 horas.

También se proporciona la preparación de un compuesto de estructura F,

30



F

en la que R<sup>5</sup>, R<sup>1</sup>, Ar y W son como se describen para las estructuras II-V. En ciertas realizaciones, una etapa de la síntesis del compuesto F es la reacción del compuesto D con HNR<sub>2</sub>, en el que HNR<sub>2</sub> es equivalente a HW. En ciertas realizaciones, la reacción se realiza en presencia de carbonato de potasio y una fuente de yoduro, tal como yoduro de cobre, yoduro de potasio, yoduro de cesio, yoduro de sodio o yoduro de tetrabutilamonio, en un disolvente aprótico polar. En ciertas realizaciones, se combinan el compuesto D y el carbonato de potasio, y se añade HNR<sub>2</sub>, seguido por la fuente de yoduro. En realizaciones preferidas, el disolvente es acetonitrilo. En ciertas realizaciones, el reactivo de yoduro es yoduro de tetrabutilamonio; en ciertas realizaciones, el reactivo de yoduro es yoduro de sodio. En ciertas realizaciones, la mezcla se mantiene en el intervalo de 50-70 °C durante un período de tiempo tal como de 5-15 horas.

35

40

En ciertas realizaciones HNR<sub>2</sub> (HW) incluye un segundo átomo de nitrógeno en el que hay un grupo protector amina. En algunas realizaciones, el grupo protector puede ser *terc*-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo, 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo o 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo. En ciertas realizaciones, la reacción se realiza en presencia de una base, tal como carbonato de potasio, carbonato de sodio, piridina, diisopropilamina, 2,6-lutidina, trietilamina, pirrolidina, imidazol o piperidina, y una fuente de yoduro en un disolvente aprótico polar. En ciertas realizaciones, la base es carbonato de potasio o trietilamina. En ciertas realizaciones, se combinan el compuesto D y la base, y se añade el HNR<sub>2</sub> seguido de la fuente de yoduro. En realizaciones preferidas, el disolvente es acetonitrilo o acetona. En ciertas realizaciones, el reactivo de yoduro es yoduro de tetrabutilamonio; en ciertas realizaciones, el reactivo de yoduro es yoduro de sodio. En ciertas realizaciones, la mezcla se mantiene en un intervalo de 70-90 °C durante un período de tiempo tal como de 1-10 horas. Tras la finalización de la reacción de adición, se puede retirar el grupo protector del producto resultante mediante una reacción de desprotección adecuada. Por ejemplo, cuando el grupo protector es *terc*-butoxicarbonilo, el grupo protector se puede eliminar mediante la adición de un ácido a una solución del compuesto (por ejemplo, la adición de una solución de HCl 4N en dioxano a una solución del producto en dioxano). En ciertas realizaciones, luego se diluye la reacción con agua y un disolvente orgánico antes de neutralizar la mezcla. En ciertas realizaciones, se basifica la mezcla mediante la adición de una solución acuosa saturada de carbonato de sodio.

Se contempla que todas las realizaciones de la invención se pueden combinar con una o más realizaciones distintas, incluso con aquellas descritas en diferentes aspectos de la invención.

El término "acilo" es reconocido en la técnica y se refiere a un grupo representado por la fórmula general hidrocarbilo-C(O)-, preferiblemente alquilo-C(O)-.

El término "acilamino" es reconocido en la técnica y se refiere a un grupo amino sustituido con un grupo acilo y se puede representar, por ejemplo, por la fórmula hidrocarbilo-C(O)NH-.

El término "aciloxilo" es reconocido en la técnica y se refiere a un grupo representado por la fórmula general hidrocarbilo-C(O)O-, preferiblemente alquilo-C(O)O-.

**[0180]** El término "alcoxilo" se refiere a un grupo alquilo, preferiblemente un grupo alquilo inferior, que tiene un oxígeno unido al mismo. Los grupos alcoxilo representativos incluyen metoxilo, etoxilo, propoxilo, *terc*-butoxilo y similares.

El término "alcoxialquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo alcoxilo y puede estar representado por la fórmula general alquilo-O-alquilo.

El término "alqueno", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo alifático que contiene al menos un enlace doble y pretende incluir tanto "alquenos no sustituidos" como "alquenos sustituidos", refiriéndose estos últimos a restos alqueno que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más átomos de carbono del grupo alqueno. Tales sustituyentes pueden darse en uno o más carbonos que estén incluidos o no incluidos en uno o más enlaces dobles. Además, tales sustituyentes incluyen todos los que se contemplan para los grupos alquilo, como se describe a continuación, excepto cuando lo prohíba la estabilidad. Se contempla, por ejemplo, la sustitución de grupos alqueno con uno o más grupos alquilo, carbociclilo, arilo, heterociclilo o heteroarilo.

El término "alquilo" se refiere al radical de grupos alifáticos saturados, incluyendo los grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo (alíclicos), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. En realizaciones preferidas, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada tiene 30 o menos átomos de carbono en su estructura (por ejemplo, C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> para cadenas lineales, C<sub>3</sub>-C<sub>30</sub> para cadenas ramificadas) y más preferiblemente 20 o menos. Del mismo modo, los cicloalquilos preferidos tienen de 3 a 10 átomos de carbono en su estructura del anillo y, más preferiblemente, tienen 5, 6 o 7 átomos de carbono en la estructura del anillo.

Además, el término "alquilo" (o "alquilo inferior") como se usa en toda la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones pretende incluir tanto los "alquilos no sustituidos" como los "alquilos sustituidos", refiriéndose estos últimos a restos alquilo que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la cadena principal de hidrocarburo. Tales sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, un halógeno, un hidroxilo, un carbonilo (tal como un carboxilo, un alcóxicarbonilo, un formilo o un acilo), un tiocarbonilo (tal como un tioéster, un tioacetato o un tioformiato), un alcoxilo, un fosforilo, un fosfato, un fosfonato, un fosfinato, un amino, un amido, una amidina, una imina, un ciano, un nitro, un azido, un sulfhidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, una sulfonamida, un sulfonilo, un heterociclilo, un aralquilo, o un resto aromático o heteroaromático. Los expertos en la técnica entenderán que los restos sustituidos en la cadena de hidrocarburo también se pueden sustituir, si procede. Por ejemplo, los sustituyentes de un alquilo sustituido pueden incluir formas sustituidas y sin sustituir de grupos amino, azido, imino, amido, fosforilo (incluyendo fosfonato y fosfinato), sulfonilo (incluyendo sulfato, sulfonamido, sulfamoilo y sulfonato) y sililo, así como éteres, alquiltios, carbonilos (incluyendo cetonas, aldehídos, carboxilatos y ésteres), -CF<sub>3</sub>, -CN y similares. Los ejemplos de alquilos sustituidos se describen a continuación. Los cicloalquilos se pueden sustituir además con alquilos, alquenos, alcoxilos, alquiltios, aminoalquilos, alquilos sustituidos con

carbonilo,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{CN}$  y similares.

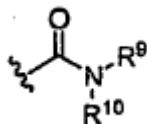
El término " $\text{C}_{x-y}$ " cuando se usa en combinación con un resto químico tal como acilo, aciloxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo o alcoxilo pretende incluir grupos que contienen de  $x$  a  $y$  carbonos en la cadena. Por ejemplo, el término "alquilo  $\text{C}_{x-y}$ " se refiere a grupos hidrocarburo saturados sustituidos o no sustituidos, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal y de cadena ramificada que contienen de  $x$  a  $y$  carbonos en la cadena, incluyendo grupos haloalquilo tales como trifluorometilo y 2,2,2-trifluoroetilo, etc. Alquilo  $\text{C}_0$  indica un hidrógeno en el que el grupo está en una posición terminal, un enlace si es interno. Los términos "alquenilo  $\text{C}_{2-y}$ " y "alquinilo  $\text{C}_{2-y}$ " se refieren a grupos alifáticos insaturados sustituidos o no sustituidos, de una longitud análoga y posible sustitución a los alquilos descritos anteriormente, pero que contienen al menos un enlace doble o triple respectivamente.

El término "alquilamino", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo amino sustituido con al menos un grupo alquilo.

El término "alquilitio", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo tiol sustituido con un grupo alquilo, y puede estar representado por la fórmula general  $\text{alquilS-}$ .

El término "alquinilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo alifático que contiene al menos un enlace triple.

El término "amida", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo



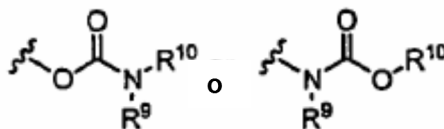
en la que cada  $\text{R}^9$  y  $\text{R}^{10}$  representa independientemente un hidrógeno o un grupo hidrocarbilo, o  $\text{R}^9$  y  $\text{R}^{10}$  tomados junto con el átomo de N al que están unidos completan un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura del anillo.

El término "alquilamino", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo amino.

El término "aralquilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo.

El término "arilo", como se usa en la presente memoria, incluye grupos aromáticos de un solo anillo en los que cada átomo del anillo es carbono. Preferiblemente, el anillo es un anillo 5 a 7 miembros, más preferiblemente un anillo de 6 miembros. El término "arilo" también incluye sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en los que al menos uno de los anillos es aromático, pudiendo ser los otros anillos cíclicos, por ejemplo, cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterocicilos. Los grupos arilo incluyen benceno, naftaleno, fenantreno, fenol, anilina y similares.

El término "carbamato" está reconocido en la técnica y se refiere a un grupo



en el que  $\text{R}^9$  y  $\text{R}^{10}$  representan independientemente hidrógeno o un grupo hidrocarbilo.

Los términos "carbociclo", "carbociclilo" y "carbocíclico", como se usan en la presente memoria, se refieren a un anillo no aromático saturado o insaturado en el que cada átomo del anillo es carbono. Preferiblemente, un anillo carbocíclico contiene de 3 a 10 átomos, más preferiblemente de 5 a 7 átomos.

El término "carbocicilalquilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo carbociclo.

El término "carbonato" está reconocido en la técnica y se refiere a un grupo  $-\text{OCO}_2-\text{R}^9$ , en el que  $\text{R}^9$  representa un grupo hidrocarbilo.

El término "carboxilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo representado por la fórmula -CO<sub>2</sub>H.

5 El término "éster", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo -C(O)OR<sup>9</sup>, en el que R<sup>9</sup> representa un grupo hidrocarbilo.

10 El término "éter", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo hidrocarbilo ligado a través de un oxígeno a otro grupo hidrocarbilo. Por consiguiente, un sustituyente de éter de un grupo hidrocarbilo puede ser hidrocarbilo-O-. Los éteres pueden ser bien simétricos o asimétricos. Los ejemplos de éteres incluyen, pero sin limitación, heterociclo-O-heterociclo y arilo-O-heterociclo. Los éteres incluyen grupos "alcoialquilo" que pueden estar representados por la fórmula general alquil-O-alquilo.

15 Los términos "halo" y "halógeno", como se usan en la presente memoria, significan halógeno e incluyen cloro, flúor, bromo y yodo.

Los términos "heteroalquilo" y "heteroaralquilo", como se usan en la presente memoria, se refieren a un grupo alquilo sustituido con un grupo hetarilo.

20 Los términos "heteroarilo" y "hetarilo" incluyen estructuras de un solo anillo aromático, preferiblemente anillos de 5 a 7 miembros, más preferiblemente de 5 a 6 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen al menos un heteroátomo, preferiblemente uno a cuatro heteroátomos, más preferiblemente uno o dos heteroátomos. Los términos "heteroarilo" y "hetarilo" también incluyen sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en los que al menos uno de los anillos es heteroaromático, pudiendo ser el resto de los anillos cíclicos, por ejemplo, cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterociclilos. Los grupos heteroarilo incluyen, por ejemplo, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina, y similares.

25 El término "heteroátomo", como se usa en la presente memoria, significa un átomo de cualquier elemento distinto de carbono o hidrógeno. Los heteroátomos preferidos son nitrógeno, oxígeno y azufre.

30 Los términos "heterociclilo", "heterociclo" y "heterocíclico" se refieren a estructuras de anillos no aromáticos sustituidos o sin sustituir, preferiblemente, anillos de 3 a 10 miembros, más preferiblemente anillos de 3 a 7 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen al menos un heteroátomo, preferiblemente de uno a cuatro heteroátomos, más preferiblemente uno o dos heteroátomos. Los términos "heterociclilo" y "heterocíclico" también incluyen sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en los que al menos uno de los anillos es heterocíclico pudiendo ser el resto de anillos cíclicos, por ejemplo, cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterociclilos. Los grupos heterociclilo incluyen, por ejemplo, piperidina, piperazina, pirrolidina, morfolina, lactonas, lactamas y similares.

40 El término "heterociclilalquilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo heterocíclico.

45 El término "hidrocarbilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo que está unido a través de un átomo de carbono que no tiene un sustituyente = O o =S, y típicamente tiene al menos un enlace carbono-hidrógeno y una estructura principal mayormente de carbonos, pero que puede incluir opcionalmente heteroátomos. Por lo tanto, los grupos de tipo metilo, etoxietilo, 2-piridilo y trifluorometilo se consideran hidrocarbilo para los fines de la presente solicitud, pero los sustituyentes tales como acetilo (que tiene un sustituyente =O en el carbono enlazado) y etoxilo (que está unido a través oxígeno, no de carbono) no lo son. Los grupos hidrocarbilo incluyen, pero sin limitación, arilo, heteroarilo, carbociclo, heterociclo, alquilo, alquenilo, alquinilo y combinaciones de los mismos.

50 El término "hidroxialquilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo hidroxilo.

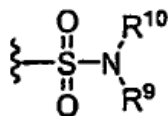
55 El término "inferior" cuando se usa en combinación con un resto químico tal como acilo, aciloxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo o alcoxilo significa que incluye grupos en los que hay diez o menos átomos distintos de hidrógeno en el sustituyente, preferiblemente seis o menos. Un "alquilo inferior", por ejemplo, se refiere a un grupo alquilo que contiene diez o menos átomos de carbono, preferiblemente seis o menos. En ciertas realizaciones, los sustituyentes acilo, aciloxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo o alcoxilo definidos en la presente memoria son, respectivamente, acilo inferior, aciloxilo inferior, alquilo inferior, alquenilo inferior, alquinilo inferior o alcoxilo inferior, tanto si se presentan solos o en combinación con otros sustituyentes tales como en el hidroxialquilo y el aralquilo citados (en cuyo caso, por ejemplo, los átomos del grupo arilo no se cuentan al contar los átomos de carbono del sustituyente alquilo).

65 Los términos "policiclilo", "policiclo" y "policíclico" se refieren a dos o más anillos (por ejemplo, cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterociclilos) en los que dos o más átomos son comunes a dos anillos adyacentes, por ejemplo, los anillos son "anillos condensados". En ciertas realizaciones, cada anillo del

policiclo contiene de 3 a 10 átomos en el anillo, preferiblemente de 5 a 7.

El término "sulfato" es reconocido en la técnica y se refiere al grupo  $-\text{OSO}_3\text{H}$  o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 El término "sulfonamida", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo representado por la fórmula general



10 en la que  $\text{R}^9$  y  $\text{R}^{10}$  representan hidrógeno.

El término "sulfóxido" está reconocido en la técnica y se refiere al grupo  $-\text{S}(\text{O})-\text{R}^9$ , en el que  $\text{R}^9$  representa un grupo hidrocarbilo.

15 El término "sulfonato" es reconocido en la técnica y se refiere al grupo  $\text{SO}_3\text{H}$  o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

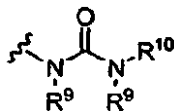
20 El término "sulfona" está reconocido en la técnica y se refiere a un grupo  $-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^9$ , en el que  $\text{R}^9$  representa un grupo hidrocarbilo.

El término "tioalquilo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo tiol.

25 El término "tioéster", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo  $-\text{C}(\text{O})\text{SR}^9$  o  $-\text{SC}(\text{O})\text{R}^9$ , en el que  $\text{R}^9$  representa un grupo hidrocarbilo.

El término "tioéter", como se usa en la presente memoria, es equivalente a un éter, en el que el oxígeno está reemplazado por un azufre.

30 El término "urea" es reconocido en la técnica y se puede representar por la fórmula general



35 en la que  $\text{R}^9$  y  $\text{R}^{10}$  representan independientemente hidrógeno o un hidrocarbilo.

El término "molécula orgánica pequeña" se refiere a un compuesto no polimérico que tiene un peso molecular de menos de 2.000 UMA. Típicamente, tales moléculas tienen un peso molecular de menos de 1.000 UMA, tal como de menos de 500 UMA.

40 Métodos para identificar dianas para compuestos selectivos del genotipo

45 Se describe además el uso del presente compuesto selectivo del genotipo, también denominado en la presente memoria "ligando" (por ejemplo, erastina) para identificar dianas, también denominadas en la presente memoria "componentes celulares" (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos o lípidos) implicado en conferir el fenotipo de células enfermas.

50 También se describen métodos para identificar componentes celulares implicados en la tumorigénesis, mediante el cual se pone en contacto una célula tumorigénica, tal como una célula, un tejido, un órgano, un organismo o un lisado tumorigénico humano manipulado genéticamente, o un extracto de los mismos, con un determinado compuesto antitumoral; y tras el contacto, se identifican los componentes celulares que interactúan (directa o indirectamente) con la erastina, produciendo la identificación de los componentes celulares implicados en la tumorigénesis. También se describe un método para identificar los componentes celulares implicados en la tumorigénesis. En este método, (a) una célula tumorigénica, tal como una célula, un tejido, un órgano, un organismo

55 o un lisado tumorigénico humano manipulado genéticamente, o un extracto de los mismos, se pone en contacto con un inhibidor de la erastina y en contacto con la erastina; y (b) se identifican los componentes celulares que interactúan (directa o indirectamente) con el inhibidor de la erastina, cuyos componentes celulares están implicados en la tumorigénesis. La célula se puede poner en contacto con erastina y con el inhibidor de erastina secuencial o

simultáneamente. Los componentes celulares que interactúan con la erastina o con cualquier agente de la presente invención se pueden identificar mediante métodos conocidos.

5 Como se describe en la presente memoria, el presente compuesto (o ligando) de estos métodos se puede crear mediante cualquier método químico. Alternativamente, el presente compuesto puede ser una biomolécula de origen natural sintetizada *in vivo* o *in vitro*. El ligando se puede derivatizar opcionalmente con otro compuesto. Una ventaja de esta modificación es que el compuesto de la derivatización se puede usar para facilitar la recogida del complejo de ligando y diana o la recogida del ligando, por ejemplo, tras la separación del ligando y la diana. Los ejemplos no restrictivos de grupos de derivatización incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína verde fluorescente, 10 isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión-S-transferasa, reticuladores fotoactivables o cualquier combinación de los mismos. Los grupos de derivatización también se pueden usar en combinación con las dianas (por ejemplo, una proteína de unión a erastina) con el fin de facilitar su detección.

15 Una diana (componente celular) puede ser una biomolécula de origen natural sintetizada *in vivo* o *in vitro*. Una diana puede estar compuesta de aminoácidos, ácidos nucleicos, azúcares, lípidos, productos naturales o cualquier combinación de los mismos. Una ventaja es que no es necesario tener un conocimiento previo de la identidad o la función de la diana.

20 La interacción entre el ligando y la diana puede ser covalente o no covalente. Opcionalmente, el ligando de un par ligando-diana puede mostrar o no mostrar afinidad por otras dianas. La diana de un par ligando-diana puede mostrar o no mostrar afinidad por otros ligandos.

25 Por ejemplo, la unión entre un ligando y una diana se puede identificar a nivel de proteínas utilizando métodos bioquímicos *in vitro*, que incluyen la fotorreticulación, la unión de ligandos radiomarcados y la cromatografía de afinidad (Jakoby W. B. *et al.*, 1974, *Methods in Enzymology* 46: 1). Alternativamente, las moléculas pequeñas se pueden inmovilizar en un soporte sólido adecuado o matriz de afinidad, tal como una matriz de agarosa, y usarlas para rastrear extractos de una variedad de tipos de células y organismos. De manera similar, las moléculas pequeñas se pueden poner en contacto con la célula, el tejido, el órgano, el organismo o el lisado, o el extracto de los mismos, pudiéndose añadir después el soporte sólido para recuperar las moléculas pequeñas y asociar las 30 proteínas diana.

35 Se puede usar la clonación de la expresión para analizar la diana de una mezcla pequeña de proteínas (King R. W. *et al.*, 1997, *Science* 277:973). Se han usado péptidos (Kieffer *et al.*, 1992, *PNAS* 89:12048), derivados nucleósidos (Haushalter K. A. *et al.*, 1999, *Curr. Biol.* 9:174) y conjugado de fármaco-albúmina de suero bovino (fármaco-ASB) (Tanaka *et al.*, 1999, *Mol. Pharmacol.* 55:356) en la clonación de la expresión.

40 Otra técnica útil para asociar estrechamente la unión del ligando con el ADN que codifica la diana es la presentación en fagos. En la presentación en fagos, que se ha usado predominantemente en el campo de los anticuerpos monoclonales, se crean bibliotecas de péptidos o proteínas en la superficie viral y se rastrean en cuanto a su actividad (Smith G. P., 1985, *Science* 228:1315). Los fagos se filtran para la diana que está conectada a una fase sólida (Parmley S. F. *et al.*, 1988, *Gene* 73:305). Una de las ventajas de la presentación en fagos es que el ADN está en el fago y, por lo tanto, no se requiere una etapa de clonación separada.

45 Un ejemplo no restrictivo incluye condiciones de reacción de unión en las que el ligando comprende un marcador tal como biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína verde fluorescente, radioisótopo, marcador de histidina, una perla magnética, una enzima o combinaciones de los mismos. En una realización de la invención, es posible rastrear las dianas en un ensayo basado en un mecanismo, tal como un ensayo para detectar los ligandos que se unen a la diana. Esto puede incluir una unión en fase sólida o fase líquida bien con el ligando o la proteína o un indicador de cualquiera que se esté detectando. Alternativamente, se puede transfectar el gen que codifica la proteína con 50 función no definida previamente con un sistema indicador (por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa o proteína verde fluorescente) en una célula y rastrear respecto a la biblioteca, preferiblemente mediante un rastreo de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Se pueden usar otros ensayos de unión basados en el mecanismo, por ejemplo, ensayos bioquímicos que midan un efecto sobre la actividad enzimática, ensayos basados en células en los que se hayan introducido la diana y un sistema indicador (por ejemplo, luciferasa o  $\beta$ -galactosidasa) en una célula y ensayos de unión que detecten cambios en la energía libre. Los ensayos de unión se 55 pueden realizar con la diana fijada a un pocillo, una perla o un chip o capturada por un anticuerpo inmovilizado, o se pueden resolver mediante electroforesis capilar. Los ligandos unidos se pueden detectar generalmente mediante un ensayo colorimétrico, ensayo de fluorescencia o resonancia de plasmones superficiales.

60 Se contemplan además métodos para tratar o prevenir una enfermedad (por ejemplo, cáncer) mediante la modulación de la función (por ejemplo, la actividad o la expresión) de una diana (componente celular) que se identifica de acuerdo con la invención. A efectos ilustrativos, si se identifica una diana que potencia el crecimiento del tumor, se puede usar un agente terapéutico para modificar o reducir la función (actividad o expresión) de la diana. Alternativamente, si se identifica una diana que inhibe el crecimiento del tumor, se puede usar un agente 65 terapéutico para aumentar la función (actividad o expresión) de la diana. El agente terapéutico incluye, pero sin limitación, un anticuerpo, un ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido o un ARN pequeño de

inhibición o ARN de interferencia), una proteína, una molécula pequeña (por ejemplo, un compuesto de la invención) o una peptidomimético.

Dianas de erastina

5 Las dianas de erastina y los análogos de erastina se denominan conjuntamente en la presente memoria dianas de erastina. Las dianas de erastina se pueden unir directa o indirectamente a la erastina o a un análogo de erastina como se describió anteriormente. Opcionalmente, la diana de erastina puede mediar en la actividad antitumoral de un compuesto tal como erastina o un análogo de erastina en una célula. Las dianas de erastina ejemplares incluyen, pero sin limitación, VDAC1, VDAC2, VDAC3, Prohibitina, Riboforina, Sec61a y Sec22b.

15 Los canales de aniones dependientes del voltaje (VDAC) son una familia de proteínas formadoras de poros codificadas por diferentes genes con al menos tres productos proteicos (VDAC1, VDAC2 y VDAC3) expresados en tejidos de mamíferos. El principal papel funcional reconocido de las VDAC es el de permitir la permeabilidad casi total de la membrana mitocondrial externa (ODF). Véase, por ejemplo, Shoshan-Barmatz *et al.*, 2003, *Cell Biochem Biophys* 39:279-92. VDAC2 y VDAC3 podrían tener una organización estructural alternativa y funciones diferentes en la ODF que en las mitocondrias (Hinsch *et al.*, 2004, *J. Biol. Chem.* 279:15281-8). En el GenBank se han depositado secuencias de VDAC representativas de diversas especies. Por ejemplo, se pueden encontrar secuencias humanas de aminoácidos y de ácidos nucleicos de VDAC1 en los números de acceso del GenBank 20 NP\_003365 y NM\_003374; se pueden encontrar secuencias humanas de aminoácidos y de ácidos nucleicos de VDAC2 en los números de acceso del GenBank NP\_003366 y NM\_003375; se pueden encontrar secuencias humanas de aminoácidos y de ácidos nucleicos de VDAC3 en los números de acceso del GenBank NP\_005653 y NM\_005662.

25 La prohibitina es un gen evolutivamente conservado que se expresa de manera omnipresente. Se cree que es un regulador negativo de la proliferación celular y puede ser un supresor tumoral (por ejemplo, Fusaro *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.* 278: 47853-47861; Fusaro *et al.*, 2002, *Oncogene* 21: 4539-4548). Se han depositado secuencias de prohibitina representativas de diversas especies en el GenBank. Por ejemplo, las secuencias humanas de aminoácidos y de ácidos nucleicos de prohibitina se pueden encontrar en los números de acceso del GenBank 30 NP\_002625 y NM\_002634.

35 Las riboforinas (por ejemplo, I y II) son proteínas que parecen estar implicadas en la unión a ribosomas. Son glucoproteínas abundantes, altamente conservadas ubicadas exclusivamente en las membranas del retículo endoplasmático rugoso (por ejemplo, Fu *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.* 275: 3984-3990; Crimauddo *et al.*, 1987, *EMBO J.* 6: 75-82). Se han depositado secuencias de riboforina representativas de diversas especies en el GenBank. Por ejemplo, las secuencias humanas de aminoácidos y de ácidos nucleicos de riboforina I se pueden encontrar en los números de acceso del GenBank NP\_002941 y NM\_002950; y las secuencias humanas de aminoácidos y de ácidos nucleicos de riboforina II se pueden encontrar en los números de acceso del GenBank NP\_002942 y NM\_002951.

40 Se ha sugerido que las proteínas Sec61-alfa desempeñan un papel en la inserción de polipéptidos de secreción y de membrana en el retículo endoplasmático (véase, por ejemplo, Higy *et al.*, 2004, *Biochemistry* 43:12716-22). Se han depositado secuencias Sec61 alfa representativas de diversas especies en el GenBank. Por ejemplo, las secuencias humanas de aminoácidos y de ácidos nucleicos de Sec61-alfa se pueden encontrar en los números de acceso del GenBank NP\_037468 y NM\_013336; las secuencias humanas de aminoácidos y de ácidos nucleicos de Sec61 alfa 45 II se pueden encontrar en los números de acceso del GenBank NP\_060614 and NM\_018144.

50 Se ha sugerido que las proteínas Sec22-beta desempeñan un papel en el tráfico de proteínas entre el ER y el aparato de Golgi, y el complejo con SNARE (por ejemplo, Parlati *et al.*, 2000, *Nature* 407:194-198; Mao *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95:8175-8180). Se han depositado secuencias de Sec61-beta representativas de varias especies en el GenBank. Por ejemplo, las secuencias humanas de aminoácidos y de ácidos nucleicos de Sec61-beta se pueden encontrar en los números de acceso del GenBank NP\_004883 y NM\_004892.

55 También se describen métodos para identificar agentes terapéuticos antitumorales candidatos mediante el uso de una diana de erastina. En tales métodos, se puede identificar un agente de ensayo que se une a una diana de erastina, o aumenta o disminuye la función (por ejemplo, la actividad o la expresión o interacciones) de una diana de erastina como un agente terapéutico antitumoral candidato. Se puede analizar además la actividad antitumoral del agente terapéutico antitumoral candidato *in vivo* o *in vitro*. Los métodos de identificación de agentes terapéuticos antitumorales candidatos se pueden llevar a cabo igualmente mediante los métodos de rastreo descritos anteriormente.

60

#### Procedimientos de administración

65 Ciertas realizaciones usan métodos para administrar proteínas (por ejemplo, antígeno T pequeño, VDAC, inhibidores de PP2A, etc.) o ADN que codifica tales proteínas a una célula diana, lo que se puede realizar mediante cualquier técnica estándar de biología molecular y de medicina molecular. Las realizaciones ilustradas a continuación son solo unas cuantas de tales técnicas que se pueden usar para tales fines.



En un aspecto, se pueden administrar construcciones de expresión de las presentes proteínas o para la generación de moléculas antisentido, en cualquier vehículo biológicamente eficaz, por ejemplo, cualquier formulación o composición capaz de transfectar efectivamente las células *in vivo* con un gen recombinante. Los enfoques incluyen la inserción del gen en cuestión en vectores virales incluyendo retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adenoasociados y el virus del herpes simple 1, o plásmidos bacterianos o eucariotas recombinantes. Los vectores virales se pueden usar para transfectar las células directamente; el ADN plasmídico se puede suministrar con la ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (por ejemplo, lipofectina) o derivatizar (por ejemplo, anticuerpo conjugado), conjugados de polilisina, gramacidina S, envolturas virales artificiales u otros vehículos intracelulares, así como la inyección directa de la construcción génica o la precipitación en CaPO<sub>4</sub> llevada a cabo *in vivo*. Se apreciará que debido a que la transducción de las células diana apropiadas representa la primera etapa crítica en la terapia génica, la elección del sistema de administración de genes en particular dependerá de factores tales como el fenotipo de la diana buscada y la vía de administración, por ejemplo, local o sistémicamente.

Un enfoque preferido para la introducción *in vivo* de ácido nucleico que codifica una de las presentes proteínas en una célula es mediante el uso de un vector viral que contiene un ácido nucleico, por ejemplo, un ADNc, que codifica el producto génico. La infección de células con un vector viral tiene la ventaja de que una gran proporción de las células diana puede recibir el ácido nucleico. Además, las moléculas codificadas dentro del vector viral, por ejemplo, mediante un ADNc contenido en el vector viral, se expresan eficazmente en células que han captado el ácido nucleico del vector viral.

En su conjunto, se entiende que los vectores retrovirales y los vectores virales adenoasociados son los sistemas de administración genes recombinantes de elección para la transferencia de genes exógenos *in vivo*, particularmente a seres humanos. Estos vectores proporcionan la administración eficaz de genes a las células, y los ácidos nucleicos transferidos se integran de manera estable en el ADN cromosómico del huésped. Un subconjunto de la familia de retrovirus, denominada "lentivirus" por la larga duración de sus fases latentes tras la integración, está representado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF). Los sistemas de vectores derivados de ambos de estos virus se han usado con eficacia en modelos preclínicos y han demostrado ser muy prometedores para una aplicación terapéutica (Humeau *et al.*, *Mol Ther.* 2004, 9(6):902-13; Curran *et al.*, *Mol Ther.* 2000, 1(1): 31-8; Engel y Kohn, *Front Biosci.* 199, 4:e26-33). A diferencia de la mayoría de los retrovirus, el VIH y VIF (y los vectores derivados de los mismos) tienen la capacidad de transducir células que no se dividen (Humeau *et al.*, *Mol Ther.* 2004, 9 (6):902-13; Curran *et al.*, *Mol Ther.* 2000, 1(1):31-8). Esta propiedad puede ser ventajosa, dependiendo del tipo de células diana. Además, el VIF se puede distinguir de otros retrovirus por su mayor capacidad de transporte de transgenes (Curran *et al.*, *Mol Ther.* 2000, 1(1): 31-8). Un prerrequisito principal para el uso de retrovirus es garantizar la seguridad de su uso, particularmente con respecto a la posibilidad de la propagación del virus de tipo natural en la población celular. El desarrollo de líneas celulares especializadas (denominadas "células de empaquetamiento") que solo producen retrovirus de replicación defectuosa ha aumentado la utilidad de los retrovirus para la terapia génica, y los retrovirus defectuosos están bien caracterizados para su uso en la transferencia de genes con fines de terapia génica (para más información, véase Miller, A. D., *Blood* 76:271, 1990). Así pues, se pueden construir retrovirus recombinantes en los que se haya reemplazado parte de la secuencia codificante retroviral (*gag*, *pol*, *env*) por ácido nucleico que codifica uno de los presentes polipéptidos, volviendo al retrovirus defectuoso en cuanto a su replicación. A continuación, se empaqueta el retrovirus de replicación defectuosa en viriones que se pueden usar para infectar una célula diana mediante el uso de un virus auxiliar por técnicas estándar. Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con tales virus se pueden encontrar en "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel, F. M. *et al.*, (eds.), John Wiley & Sons, Inc., Greene Publishing Associates, (2001), Secciones 9.9-9.14 y otros manuales de laboratorio estándar. Los ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM, que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de líneas de empaquetamiento de virus adecuadas para la preparación de sistemas retrovirales tanto ecotrópicos como anfotrópicos incluyen  $\psi$ Crip,  $\psi$ Cre,  $\psi$ 2 y  $\psi$ Am. Los retrovirus se han usado para introducir una variedad de genes en muchos tipos de células diferentes, incluyendo células neuronales, células epiteliales, células endoteliales, linfocitos, mioblastos, hepatocitos, células de la médula ósea, *in vitro* y/o *in vivo* (véase por ejemplo Eglitis *et al.*, *Science* 230:1395-1398, 1985; Danos y Mulligan, *PNAS EE.UU.*, 85:6460-6464, 1988; Wilson *et al.*, *PNAS EE.UU.*, 85:3014-3018, 1988; Armentano *et al.*, *PNAS EE.UU.*, 87: 6141-6145, 1990; Huber *et al.*, *PNAS EE.UU.* 88:8039-8043, 1991; Ferry *et al.*, *PNAS EE.UU.* 88:8377-8381, 1991; Chowdhury *et al.*, *Science* 254:1802-1805, 1991; van Beusechem *et al.*, *PNAS EE.UU.* 89:7640-7644, 1992; Kay *et al.*, *Human Gene Therapy* 3:641-647, 1992; Dai *et al.*, *PNAS EE.UU.* 89:10892-10895, 1992; Hwu *et al.*, *J. Immunol.* 150:4104-4115, 1993; Patente de Estados Unidos N° 4.868.116; Patente de Estados Unidos N° 4.980.286; Solicitud PCT WO 89/07136; Solicitud PCT WO 89/02468; Solicitud PCT WO 89/05345; y Solicitud PCT WO 92/07573).

Además, se ha demostrado que es posible limitar el espectro de infección de los retrovirus y, por consiguiente, de vectores basados en retrovirus, modificando las proteínas de empaquetamiento viral en la superficie de la partícula viral (véanse, por ejemplo, las publicaciones WO93/25234, WO94/06920 y WO94/11524). Por ejemplo, las estrategias para la modificación del espectro de infección de vectores retrovirales incluyen: anticuerpos de acoplamiento específicos de antígenos de la superficie celular de la proteína env viral (Roux *et al.*, *PNAS EE.UU.*, 86:9079-9083, 1989; Julian *et al.*, *J. Gen Virol* 73:3251-3255, 1992; y Goud *et al.*, *Virology* 163:251-254, 1983); o acoplamiento de ligandos de la superficie celular a las proteínas env virales (Neda *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266: 14143-14146, 1991). El acoplamiento puede estar en forma de reticulación química con una proteína u otra variedad (por

ejemplo, lactosa para convertir la proteína env en una asialoglicoproteína), así como mediante la generación de proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión de anticuerpo monocatenario/env). Esta técnica, aunque útil para limitar o dirigir de otra manera la infección a determinados tipos de tejido, también se puede usar para convertir un vector ecotrópico en un vector anfotrópico.

5 Otro sistema de administración de genes virales útil utiliza vectores derivados de adenovirus. El genoma de un adenovirus se puede manipular de modo que codifique un producto génico de interés, pero sea inactivo en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo normal de vida viral lítico (véase, por ejemplo, Berkner *et al.*, *BioTechniques* 6:616, 1988; Rosenfeld *et al.*, *Science* 252: 431-434, 1991; y Rosenfeld *et al.*, *Cell* 68:143-155, 10 1992). Los vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus tipo Ad 5 d1324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7, etc.) son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en determinadas circunstancias en tanto en cuanto no son capaces de infectar células que no se dividen y se pueden usar para infectar una amplia variedad de tipos de células, incluyendo el epitelio de las vías respiratorias (Rosenfeld *et al.*, (1992) citado *supra*), células endoteliales (Lemarchand *et al.*, *PNAS EE.UU.* 89:6482-6486, 1992), hepatocitos (Herz y Gerard, *PNAS EE.UU.* 90:2812-2816, 1993) y células musculares (Quantin *et al.*, *PNAS EE.UU.* 89:2581-2584, 1992). Además, la partícula de virus es relativamente estable, susceptible a la purificación y la concentración, y como se ha descrito anteriormente, se puede modificar para afectar al espectro de infectividad. Además, el ADN adenoviral introducido (y el ADN foráneo contenido en el mismo) no se integra en el genoma de una célula huésped, sino que permanece episomal, evitando así los posibles 20 problemas acarreados como consecuencia de la mutagénesis de inserción en situaciones en las que el ADN introducido se integra en el genoma huésped (por ejemplo, ADN retroviral). Además, la capacidad de transporte del genoma adenoviral para el ADN foráneo es grande (de hasta 8 kilobases) con relación a otros vectores de administración de genes (Berkner *et al.*, *supra*; Haj-Ahmand y Graham *J. Virol.* 57:267, 1986). La mayoría de los vectores adenovirales de replicación defectuosa que se encuentran actualmente en uso y, por tanto, que son favorecidos por la presente invención se eliminan para todos o partes de los genes virales E1 y E3, pero conservan tanto como el 80% del material genético adenoviral (véase, por ejemplo, Jones *et al.*, *Cell* 16:683, 1979; Berkner *et al.*, *supra*; y Graham *et al.*, en "Methods in Molecular Biology", E. J. Murray, Ed. (Humana, Clifton, NJ, 1991) vol. 7. p. 109-127). La expresión del gen insertado puede estar bajo el control de, por ejemplo, el promotor de E1A, el promotor tardío principal (MLP) y secuencias líder asociadas, el promotor E3 viral o secuencias promotoras añadidas 30 exógenamente.

Otro sistema de vectores virales más que es útil para la administración de los presentes genes es el virus adenoasociado (VAA). El virus adenoasociado es un virus defectuoso natural que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un virus del herpes, como virus auxiliar para tener una replicación eficiente y un ciclo de vida productivo. (Para más información, véase Muzyczka *et al.*, *Curr. Topics in Micro. Immunol.* (1992) 158:97-129, 35 1992). También es uno de los pocos virus que pueden integrar su ADN en células que no se dividen, y presenta una alta frecuencia de integración estable (véase, por ejemplo, Flotte *et al.*, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356, 1992; Samulski *et al.*, *J. Virol.* 63:3822-3828, 1989; y McLaughlin *et al.*, *J. Virol.* 62: 25 1963-1973, 1989). Los vectores que contienen tan poco como 300 pares de bases de VAA se pueden empaquetar y se pueden integrar. El espacio para el ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Un vector de VAA tal como el descrito en Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260, 1985 se puede usar para introducir ADN en células. Se ha introducido una variedad de ácidos nucleicos en diferentes tipos de células usando vectores de VAA (véase, por ejemplo, Hermonat *et al.*, *PNAS EE.UU.* 81:6466-6470, 1984; Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081, 1985; Wondisford *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 2:32-39, 1988; Tratschin *et al.*, *J. Virol.*, 51:611-619, 30 1984; y Flotte *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790, 1993).

Otros sistemas de vectores virales que pueden tener aplicación en la terapia génica se han obtenido de virus del herpes, virus *vaccinia* y varios virus de ARN. En particular, los vectores del virus del herpes pueden proporcionar una estrategia única para la persistencia del gen recombinante en cuestión en las células del sistema nervioso 50 central y del tejido ocular (Pepose *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:2662-2666, 1994).

Además de los métodos de transferencia viral tales como los ilustrados anteriormente, también se pueden emplear métodos no virales para producir la expresión de una determinada proteína en el tejido de un animal. La mayoría de los métodos no virales de transferencia génica se basan en los mecanismos normales usados por las células de mamífero para la captación y el transporte intracelular de macromoléculas. En realizaciones preferidas, los sistemas de administración de genes no virales de la presente invención se basan en vías endocíticas para la captación de un determinado gen por la célula diana. Los ejemplos de sistemas de administración de genes de este tipo incluyen sistemas derivados de liposomas, conjugados de poli-lisina y envolturas virales artificiales.

60 En una realización representativa, es posible atrapar un gen que codifica un determinado polipéptido en liposomas que portan cargas positivas en su superficie (por ejemplo, lipofectinas) y que (opcionalmente) están marcados con anticuerpos contra antígenos de la superficie celular del tejido diana (Mizuno *et al.*, *No Shinkei Geka* 20:547-551, 1992; publicación PCT WO91/06309; solicitud de patente japonesa N° 1047381; y publicación de patente europea EP-A-43075). Por ejemplo, la lipofección de células de neuroglioma se puede llevar a cabo usando liposomas marcados con anticuerpos monoclonales contra antígeno asociado a glioma (Mizuno *et al.*, *Neurol. Med. Chir.* 32:873-876, 1992).

En otra realización ilustrativa más, el sistema de administración de genes comprende un anticuerpo o un ligando de la superficie celular que está reticulado con un agente de unión a genes, tal como poli-lisina (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO93/04701, WO92/22635, WO92/20316, WO92/19749 y WO92/06180). Por ejemplo, se puede usar la construcción de un determinado gen para transfectar células específicas *in vivo* usando un vehículo de polinucleótido soluble que comprenda un anticuerpo conjugado a un poli-cation, por ejemplo, poli-lisina (véase la patente de EE.UU. N° 5.166.320). También se apreciará que es posible mejorar la administración eficaz de las construcciones de ácido nucleico a través de endocitosis mediada por péptidos usando agentes que potencien el escape del gen de las estructuras endosómicas. Por ejemplo, se pueden usar adenovirus enteros o péptidos de fusión del producto génico HA de la gripe como parte del sistema de administración para inducir la interrupción eficiente de endosomas que contienen ADN (Mulligan *et al.*, *Science* 260-926, 1993; Wagner *et al.*, *PNAS* EE.UU. 89:7934, 1992; y Christiano *et al.*, *PNAS* EE.UU. 90:2122, 1993).

En el ámbito clínico, los sistemas de administración de genes se pueden introducir en un paciente mediante cualquiera de una serie de métodos, cada uno de los cuales es familiar en la técnica. Por ejemplo, se puede introducir sistemáticamente una preparación farmacéutica del sistema de administración de genes, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, y la transducción específica de la construcción en las células diana se produce predominantemente a partir de la especificidad de la transfección proporcionada por el vehículo de administración de genes, la expresión del tipo de célula o del tipo de tejido debido a las secuencias reguladoras de la transcripción que controlan la expresión del gen o una combinación de los mismos. En otras realizaciones, la administración inicial del gen recombinante está más restringida, siendo la introducción en el animal bastante localizada. Por ejemplo, el vehículo de administración de genes se puede introducir a través de un catéter (véase la patente de EE.UU. N° 5.328.470) o una inyección estereotáctica (por ejemplo, Chen *et al.*, *PNAS* EE.UU. 91: 3054-3057, 1994).

Además, las proteínas en cuestión se pueden proporcionar como un péptido de fusión junto con un segundo péptido que potencie la "transcitos", por ejemplo, la absorción del péptido por las células diana. A modo ilustrativo, la presente proteína se puede proporcionar como parte de un polipéptido de fusión con todo o un fragmento del dominio N-terminal de la proteína Tat del VIH, por ejemplo, los residuos 1-72 de Tat o un fragmento más pequeño de la misma que pueda potenciar la transcitos. En otras realizaciones, el presente polipéptido se puede proporcionar como un polipéptido de fusión con toda o una porción de la proteína antennapedia III. También se han usado eficazmente péptidos sintéticos para transportar proteínas, péptidos y pequeñas moléculas a través de las membranas biológicas, incluyendo la barrera hematoencefálica y, por tanto, pueden ser aplicables en esta aplicación. (Rothbard *et al.*, *Nat Med.* 2000, 6 (11): 1253-7; Rothbard *et al.*, *J Med Chem.* 2002, 45(17): 3612-8). Aunque los ejemplos de secuencias de transducción de proteínas sintéticas proporcionados se caracterizan por una alta densidad de los residuos de arginina, se podrían sustituir por otras moléculas o secuencias funcionalmente similares pero estructuralmente diferentes.

Para seguir ilustrando, el presente polipéptido (o peptidomimético) se puede proporcionar como un péptido quimérico que incluye una secuencia de péptido heterólogo ("péptido de internalización" o "dominio de internalización") que impulsa la translocación de una forma extracelular de la presente secuencia polipeptídica a través de una membrana celular con el fin de facilitar la localización intracelular del presente polipéptido. A este respecto, el presente polipéptido terapéutico es aquel que es activo intracelularmente. El péptido de internalización, por sí mismo, es capaz de atravesar una membrana celular mediante, por ejemplo, transcitos, a una velocidad relativamente alta. El péptido de internalización está conjugado, por ejemplo, como una proteína de fusión, con el presente polipéptido, opcionalmente de una manera escindible. El péptido quimérico resultante se transporta a las células a una velocidad superior a la del polipéptido activador solo, proporcionando así un medio para mejorar su introducción en las células a las que se aplica, por ejemplo, para mejorar las aplicaciones tópicas del presente polipéptido. Además de las proteínas y los peptidomiméticos, se puede acoplar un agente del fármaco a un compuesto que mejore la administración de una sustancia (por ejemplo, compuestos mediados por el receptor tales como la vitamina B<sub>12</sub>).

En una realización, el péptido de internalización se obtiene de la proteína antennapedia de *Drosophila* u homólogos de la misma. Se ha demostrado que el homeodominio de 60 aminoácidos de longitud de la homeoproteína antenapedia se translocaliza a través de las membranas biológicas y puede facilitar la translocación de los polipéptidos heterólogos a los que está acoplada. Véase, por ejemplo, Derossi *et al.* (1994) *J Biol Chem* 269:10444-10450; y Perez *et al.* (1992) *J Cell Sci* 102:717-722. Se ha demostrado que fragmentos tan pequeños como de 16 aminoácidos de longitud de esta proteína son suficientes para activar la internalización. Véase Derossi *et al.* (1996) *J Biol Chem* 271:18188-18193.

También se proporciona una secuencia de polipéptido (antígeno T pequeño o VDAC) o de peptidomimético como se describe en la presente memoria, y al menos una parte de la proteína *Antennapedia* (u homólogo de la misma) suficiente para aumentar el transporte transmembrana de la proteína quimérica, con respecto al presente polipéptido o peptidomimético, en una cantidad estadísticamente significativa. Tal polipéptido o peptidomimético del mismo se puede usar en los presentes métodos para ayudar de manera eficiente y específica a destruir las células cancerosas.

Otro ejemplo de un péptido de internalización es la proteína transactivadora (TAT) del VIH. Esta proteína parece estar dividida en cuatro dominios (Kuppuswamy *et al.* (1989) *Nucl. Acids Res.* 17:3551-3561). La proteína TAT purificada es absorbida por las células en cultivo tisular (Frankel y Pabo, (1989) *Cell* 55:1189-1193) y los péptidos tales como el fragmento correspondiente a los residuos 37-62 de TAT son rápidamente absorbidos por la célula *in vitro* (Green y Loewenstein, (1989) *Cell* 55:1179-1188). La región altamente básica media en la internalización en y el direccionamiento del resto de internalización hacia el núcleo (Ruben *et al.*, (1989) *J. Virol.* 63:1-8).

Es posible generar otro polipéptido transcelular ejemplar para incluir una porción suficiente de mastoparín (T. Higashijima *et al.*, *Biol.* (1990) *J. Chem.* 265:14176) con el fin de aumentar el transporte transmembrana de la proteína quimérica.

Aunque no se desea quedar vinculados a ninguna teoría en particular, se observa que los polipéptidos hidrófilos también se pueden transportar fisiológicamente a través de las barreras de membranas mediante el acoplamiento o la conjugación del polipéptido a un péptido transportable que sea capaz de atravesar la membrana mediante transcitosis mediada por el receptor. Los péptidos de internalización adecuados de este tipo se pueden generar usando toda o una parte de, por ejemplo, una histona, insulina, transferrina, albúmina básica, prolactina, insulina y factor de crecimiento de tipo insulina I (IGF-I), factor de crecimiento de tipo insulina II (IGF -II) o otros factores de crecimiento. Por ejemplo, se ha descubierto que un fragmento de insulina, que muestra afinidad por el receptor de la insulina en las células capilares y que es menos eficaz que la insulina en la reducción del azúcar en sangre, es capaz de transportarse entre las membranas mediante transcitosis mediada por el receptor y que, por lo tanto, puede servir como un péptido de internalización para los presentes péptidos transcelulares y peptidomiméticos. Los péptidos de internalización derivados de factores de crecimiento preferidos incluyen péptidos derivados del EGF (factor de crecimiento epidérmico), tales como CMHIESLDSYTC y CMYIEALDKYAC; péptidos derivados del TGF-beta (factor de crecimiento transformante beta); péptidos derivados del PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) o PDGF-2; péptidos derivados del IGF-I (factor de crecimiento de tipo insulina) o IGF-II; y péptidos derivados del FGF (factor de crecimiento de fibroblastos).

Otra clase de péptidos de translocación/internalización muestra una unión a la membrana dependiente del pH. Para un péptido de internalización que adopta una conformación helicoidal a un pH ácido, el péptido de internalización adquiere la propiedad de anfifilicidad, por ejemplo, tiene interfases tanto hidrófoba e hidrófila. Más específicamente, dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5,0-5,5, un péptido de internalización forma una hélice alfa, estructura anfifílica que facilita la inserción del resto en una membrana diana. Un entorno de pH ácido inductor de hélices alfa se puede encontrar, por ejemplo, en el entorno de bajo pH presente dentro de los endosomas celulares. Tales péptidos de internalización se pueden usar para facilitar el transporte del presente polipéptido y peptidomiméticos, absorbidos mediante un mecanismo endocítico, desde los compartimentos endosómicos hacia el citoplasma.

Un péptido de internalización de unión a la membrana dependiente del pH preferido incluye un alto porcentaje de residuos formadores de hélice, tales como glutamato, metionina, alanina y leucina. Además, una secuencia de péptido de internalización preferida incluye residuos ionizables que tienen pKa en el intervalo de pH 5-7, de modo que habrá un dominio de unión a la membrana no cargado presente dentro del péptido a un pH 5 para permitir la inserción en la membrana de la célula diana.

Un péptido de internalización de unión a la membrana dependiente del pH particularmente preferido a este respecto es aa1-aa2-aa3-EAALA(EALA)4-EALEALAA-amida, que representa una modificación de la secuencia peptídica de Subbarao *et al.* (*Biochemistry*, 26:2964, 1987). Dentro de esta secuencia peptídica, el primer residuo de aminoácido (aa1) es preferiblemente un residuo único, tal como cisteína o lisina, que facilita la conjugación química del péptido de internalización a un conjugado de proteína diana. Los residuos de aminoácidos 2-3 se pueden seleccionar para modular la afinidad del péptido de internalización por diferentes membranas. Por ejemplo, si los dos residuos 2 y 3 son Lys o Arg, el péptido de internalización tendrá la capacidad de unirse a membranas o bolsas de lípidos que tengan una carga superficial negativa. Si los residuos 2-3 son aminoácidos neutros, el péptido de internalización se insertará en membranas neutras.

Sin embargo, otros péptidos preferidos de internalización más incluyen péptidos de la apo-lipoproteína A-1 y B; toxinas peptídicas tales como melitina, bombolitina, hemolisina delta y las pardaxinas; péptidos antibióticos tales como alameticona; hormonas peptídicas tales como calcitonina, factor de liberación de corticotropina, endorfina beta, glucagón, hormona paratiroidea, polipéptido pancreático; y péptidos correspondientes a secuencias señal de numerosas proteínas secretadas. Además, los péptidos de internalización ejemplares se pueden modificar a través de la unión de sustituyentes que potencian el carácter alfa-helicoidal del péptido de internalización a pH ácido.

Otra clase de péptidos de internalización adecuados más para su uso incluye los dominios hidrófobos que están "ocultos" a pH fisiológico, pero que se dejan ver en el medio de bajo pH del endosoma de la célula diana. Tras el despliegue y la exposición del dominio hidrófobo inducidos por el pH, el resto se une a las bicapas lipídicas y efectúa la translocación del polipéptido unido covalentemente en el citoplasma celular. Tales péptidos de internalización se pueden modelar una vez identificadas las secuencias, por ejemplo, en exotoxina A de *Pseudomonas*, clatrina o toxina de la difteria.

Las proteínas o los péptidos formadores de poros también pueden servir como los péptidos de internalización en la presente memoria. Las proteínas o los péptidos formadores de poros se pueden obtener o derivar, por ejemplo, de proteína del complemento C9, moléculas de linfocitos T citolíticos o moléculas de células NK. Estos restos son capaces de formar estructuras de forma anular en membranas, permitiendo así el transporte de polipéptido unido a través de la membrana y hacia el interior de la célula.

La simple intercalación en la membrana de un péptido de internalización puede ser suficiente para la translocación del presente polipéptido o peptidomimético a través de las membranas celulares. Sin embargo, es posible mejorar la translocación uniendo el péptido de internalización a un sustrato para enzimas intracelulares (es decir, un "péptido auxiliar"). Se prefiere la unión de un péptido auxiliar a una o varias partes del péptido de internalización que sobresale a través de la membrana celular hacia la cara citoplasmática. El péptido auxiliar se puede unir ventajosamente a un extremo de un resto de translocación/internalización o péptido de anclaje. Un resto auxiliar de la presente invención puede contener uno o más residuos de aminoácidos. En una realización, un resto auxiliar puede proporcionar un sustrato para la fosforilación celular (por ejemplo, el péptido auxiliar puede contener un residuo de tirosina).

Un resto auxiliar ejemplar a este respecto sería un sustrato peptídico para la N-miristoil transferasa tal como GNAAAARR (Eubanks *et al.*, en: "Peptides. Chemistry and Biology", Garland Marshall (ed-), ESCOM, Leiden, 1988, p. 566-69). En esta construcción, se uniría un péptido de internalización al extremo C-terminal del péptido auxiliar, puesto que la glicina N-terminal es fundamental para la actividad del resto auxiliar. Este péptido híbrido, tras la unión a un péptido o peptidomimético E2 en su extremo C-terminal, se somete a N-miristilación y se ancla mejor a la membrana de la célula diana, por ejemplo, sirviendo para aumentar la concentración local del péptido en la membrana celular.

Para ilustrar mejor el uso de un péptido auxiliar, primero se une covalentemente un péptido auxiliar capaz de ser fosforilado al extremo C-terminal de un péptido de internalización y luego se incorpora a una proteína de fusión con el presente polipéptido o peptidomimético. El componente peptídico de la proteína de fusión se intercala en la membrana plasmática de la célula diana y, como resultado de ello, el péptido auxiliar se translocaliza a través de la membrana y sobresale hacia el citoplasma de la célula diana. En el lado citoplasmático de la membrana plasmática, el péptido auxiliar es fosforilado por cinasas celulares a pH neutro. Una vez fosforilado, el péptido auxiliar actúa para fijar irreversiblemente la proteína de fusión a la membrana. La ubicación en la membrana de la superficie celular puede aumentar la translocación del polipéptido en el citoplasma celular.

Los péptidos auxiliares adecuados incluyen péptidos que son sustratos de quinasa, péptidos que poseen una sola carga positiva y péptidos que contienen secuencias que son glucosiladas por glucotransferasas unidas a la membrana. Los péptidos auxiliares que son glucosilados por glucotransferasas unidas a la membrana puede incluir la secuencia x-NLT-x, en la que "x" puede ser otro péptido, un aminoácido, agente de acoplamiento o molécula hidrófoba, por ejemplo. Cuando este tripéptido hidrófobo se incubaba con vesículas microsomales, atraviesa las membranas vesiculares, es glucosilado en el lado luminal y queda atrapado dentro de las vesículas debido a su carácter hidrófilo (C. Hirschberg *et al.*, (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56:63-87). Por lo tanto, los péptidos auxiliares que contienen la secuencia X-NLT-x mejorarán la retención en las células diana del correspondiente polipéptido.

En otra realización, se puede usar un péptido auxiliar para mejorar la interacción de un polipéptido o peptidomimético con la célula diana. Los péptidos auxiliares ejemplares a este respecto incluyen péptidos derivados de proteínas de adhesión celular que contienen la secuencia "RGD" o péptidos derivados de la laminina que contiene la secuencia CDPGYIGSRC. Las glucoproteínas de la matriz extracelular, tales como la fibronectina y la laminina, se unen a las superficies celulares a través de procesos mediados por el receptor. Una secuencia tripeptídica, RGD, se ha identificado como necesaria para la unión a los receptores de la superficie celular. Esta secuencia está presente en la fibronectina, vitronectina, C3bi del complemento, factor de von-Willebrand, receptor de EGF, factor de crecimiento transformante beta, colágeno de tipo I, receptor lambda de *E. Coli*, fibrinógeno y la proteína de la cubierta de Sindbis (E. Ruoslahti, *Ann. Rev. Biochem.* 57:375-413, 1988). Los receptores de la superficie celular que reconocen secuencias RGD se han agrupado en una superfamilia de proteínas relacionadas designadas "integrinas". La unión de los "péptidos RGD" a las integrinas de la superficie celular potenciará la retención en la superficie celular, y en última instancia, la translocación del polipéptido.

De acuerdo con lo descrito anteriormente, los péptidos auxiliares y de internalización se pueden añadir, cada uno independientemente, al polipéptido o peptidomimético bien mediante reticulación química o en forma de una proteína de fusión. En el caso de las proteínas de fusión, se pueden incluir ligadores polipeptídicos no estructurados entre cada uno de los restos peptídicos.

En general, el péptido de internalización será suficiente para la exportación directa del polipéptido. No obstante, cuando se proporciona un péptido auxiliar, tal como una secuencia RGD, puede ser necesario incluir una secuencia de señal de secreción para dirigir la exportación de la proteína de fusión desde su célula huésped. En realizaciones preferidas, la secuencia de señal de secreción se ubica en el extremo N-terminal y está (opcionalmente) flanqueada por un sitio proteolítico entre la señal de secreción y el resto de la proteína de fusión.

En una realización ejemplar, se manipula genéticamente un polipéptido o peptidomimético para que incluya una señal de localización nuclear de péptido RGD/SV40 de unión a integrina (véase, por ejemplo, Hart S. L. *et al.*, 1994; *J. Biol. Chem.*, 269:12468-12474), tal como la codificada por la secuencia de nucleótidos proporcionada en el fragmento de Nde1-EcoR1: catatggutgactgccgtggcgatattgtcggttgcggtgctcctccaaaaagaagagaaaggtagctggattc, que codifica la secuencia de nucleótidos de RGD/SV40: MGGCRGDMFGCGAPPKKRKRKRVAGF. En otra realización, se puede manipular genéticamente la proteína con el polipéptido tat(1-72) del VIH-1, por ejemplo, como el proporcionado por el fragmento de Nde1-EcoR1: catatggagccagtagatcctagactagagccctggaagcatccaggaagtcagcctaaaactgctgtacceattgctattgtaaaaagtgttcttcattgccaagtgtttcatacaaaaagcccttgccatctcctatggcaggaagaagcgagacagcgacgaagacctcctcaaggcagtcagactcatcaagtttcttaagtaagcaaggattc, que codifica la secuencia del péptido tat(1-72) del VIH-1: MEPVDPRLPWPVKHPGSQPKTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKALGISYGRKK RRQRRRPPQGSQTHQVLSLKQ. En otra realización más, la proteína de fusión incluye el polipéptido VP22 del VIH-1 (Elliott G., O'Hare P (1997) *Cell*, 88:223-233) proporcionado por el fragmento Nde1-EcoR1. En otra realización más, la proteína de fusión incluye el dominio C-terminal de la proteína VP22 de, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos (fragmento Nde1-EcoR1).

En ciertos casos, también puede ser deseable incluir una señal de localización nuclear como parte del presente polipéptido. En la generación de polipéptidos de fusión que incluyen un polipéptido, puede ser necesario incluir ligadores no estructurados con el fin de asegurar un plegamiento apropiado de los diversos dominios peptídicos. En la técnica, se conocen muchos enlazadores sintéticos y naturales, y se pueden adaptar para su uso en la presente invención, incluyendo el ligador (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>4</sub>.

### Métodos de tratamiento

Los términos "cáncer", "tumor" y "neoplasia" se usan indistintamente en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, un cáncer (tumor o neoplasia) se caracteriza por una o más de las siguientes propiedades: el crecimiento celular no está regulado por las influencias bioquímicas y físicas normales del medio ambiente; la anaplasia (por ejemplo, falta de diferenciación celular coordinada normal); y en algunos casos, la metástasis. Las enfermedades de cáncer incluyen, por ejemplo, carcinoma anal, carcinoma de vejiga, carcinoma de mama, carcinoma de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, carcinoma de endometrio, leucemia de células pilosas, carcinoma de cabeza y cuello, carcinoma de pulmón (de células pequeñas), mieloma múltiple, linfoma de no Hodgkin, linfoma folicular, carcinoma de ovario, tumores cerebrales, carcinoma colorrectal, carcinoma hepatocelular, sarcoma de Kaposi, carcinoma de pulmón (de células no pequeñas), melanoma, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, carcinoma de células renales y sarcoma de tejidos blandos. Se pueden encontrar otros trastornos cancerosos adicionales, por ejemplo, en Isselbacher *et al.*, (1994) "Harrison's Principles of Internal Medicine" 1814-1877, incorporado en la presente memoria por referencia.

Típicamente, los cánceres descritos anteriormente y que se pueden tratar mediante los métodos descritos en la presente memoria presentan una expresión no regulada de VDAC. En una realización, los cánceres descritos anteriormente contienen una mutación en la vía de señalización de Ras, lo que produce una elevada actividad de señalización de Ras. Por ejemplo, la mutación podría ser una mutación constitutivamente activa en el gen Ras, tal como Ras V12. En otras realizaciones, el cáncer puede contener mutaciones de pérdida de función en PP2A y/o mutaciones activadoras de MEK1 y/o ERK1. En ciertas realizaciones adicionales, el cáncer se caracteriza por células que expresan la oncoproteína T pequeña de SV40 o son fenotípicamente similares a células que expresan ST y/o HRAS oncogénica. En ciertas realizaciones preferidas, las células expresan un nivel sustancialmente de tipo natural de Rb (por ejemplo, de al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130% o 150 %, etc.).

También se describe un método para tratar o prevenir el cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que es selectivamente tóxico para una célula tumorigénica humana manipulada genéticamente o una célula cancerosa de un genotipo específico (o genotipo alterado específicamente). En ciertas realizaciones, el cáncer se caracteriza por células que comprenden una vía de RAS activada. En ciertas realizaciones adicionales, el cáncer se caracteriza por células que expresan la oncoproteína T pequeña de SV40 o que presentan modulaciones de las dianas de sT y/o RAS oncogénica.

En una realización relacionada, se trata la práctica del método de la invención en combinación con otras terapias antitumorales tales como la quimioterapia convencional dirigida contra tumores sólidos y para el control del establecimiento de las metástasis. La administración de los compuestos de la invención se puede llevar a cabo durante o después de la quimioterapia. Tales agentes se formulan típicamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable y se pueden administrar por vía intravenosa, oral, bucal, parenteral, en un pulverizado por inhalación, mediante aplicación tópica o transdérmica. También se puede administrar un agente mediante administración local. Preferiblemente, uno o más agentes adicionales administrados en combinación con un agente quimioterapéutico contra el cáncer (por ejemplo, un compuesto de la invención) inhiben las células cancerosas de una forma aditiva o sinérgica.

Se ha observado que existe una amplia gama de compuestos convencionales que tienen actividades antitumorales. Estos compuestos se han usado como agentes farmacéuticos en quimioterapia para reducir los tumores sólidos,

prevenir la metástasis y el crecimiento adicional o reducir el número de células malignas en tumores de médula ósea o leucémicos. Aunque la quimioterapia ha sido eficaz en el tratamiento de diversos tipos de tumores malignos, muchos compuestos antitumorales provocan efectos secundarios indeseables. En muchos casos, cuando se combinan dos o más tratamientos diferentes, los tratamientos pueden funcionar sinérgicamente, permitiendo la

5 reducción de la dosis de cada uno de los tratamientos, lo que reduce los efectos secundarios perjudiciales ejercidos por cada compuesto a dosis más elevadas. En otros casos, los tumores malignos que son refractarios a un tratamiento pueden responder a una terapia de combinación de dos o más tratamientos diferentes.

Por lo tanto, los compuestos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar

10 junto con un compuesto antitumoral convencional. Los compuestos antitumorales convencionales incluyen, simplemente a efectos ilustrativos: aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, asparaginasa, bcg, bicalutamida, bleomicina, buserelina, busulfán, camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucil, cisplatino, cladribina, clodronato, colchicina, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, dienestrol, dietilestilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, estradiol, estramustina, etopósido, exemestano,

15 filgrastim, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, genisteína, goserelina, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, interferón, irinotecán, ironotecán, letrozol, leucovorina, leuprolida, levamisol, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, nocodazol, octreotida, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, porfímero, procarbazona, raltitrexed, riruximab, estreptozocina, suramina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testosterona, tioguanina, tiotepa, dicloruro de titanoceno, topotecán,

20 trastuzumab, tretinoína, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina.

En otras realizaciones, los compuestos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar conjuntamente con un compuesto antitumoral convencional seleccionado entre: un antagonista del

25 receptor de EGF, sulfuro arsénico, adriamicina, cisplatino, carboplatino, cimetidina, carminomicina, clorhidrato de mecloretamina, pentametilmelamina, tiotepa, tenipósido, ciclofosfamida, clorambucil, demetoxihipocrelina A, melfalán, ifosfamida, trofosfamida, treosulfán, podofilotoxina o derivados de podofilotoxina, fosfato de etopósido, tenipósido, etopósido, leurosina, leurosina, vindesina, 9-aminocamptotecina, camptoirinotecán, crisnatol, megestrol, metopterina, mitomicina C, ecteinascidina 743, busulfán, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU),

30 lovastatina, ión de 1-metil-4-fenilpiridinio, semustina, estaurosporina, estreptozocina, ftalocianina, dacarbazina, aminopterina, metotrexato, trimetrexato, tioguanina, mercaptopurina, fludarabina, pentastatina, cladribina, citarabina (ara C), porfiromicina, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, clorhidrato de doxorubicina, leucovorina, ácido micofenólico, daunorrubicina, deferoxamina, floxuridina, doxiluridina, raltitrexed, idarubicina, epirubicán, pirarubicán, zorubicina, mitoxantrona, sulfato de bleomicina, actinomicina D, safracinas, saframincinas, quinocarcinas, discodermolidas, vincristina, vinblastina, tartrato de vinorelbina, vertoporfina, paclitaxel, tamoxifeno, raloxifeno,

35 tiazofurán, tioguanina, ribavirina, EICAR, estramustina, fosfato sódico de estramustina, flutamida, bicalutamida, buserelina, leuprolida, pteridinas, enediinas, levamisol, aflacón, interferón, interleucinas, aldesleucina, filgrastim, sargramostim, rituximab, BCG, tretinoína, betametosona, clorhidrato de gemcitabina, verapamil, VP-16, altretamina, tapsigargina, oxaliplatino, iroplatinato, tetraplatino, lobaplatino, DCP, PLD-147, JM118, JM216, JM335, satraplatino, docetaxel, paclitaxel desoxigenado, TL-139, 5'-nor-anhidrovinblastina (de aquí en adelante: 5'-nor-vinblastina), camptotecina, irinotecán (Camptosar, CPT-11), topotecán (Hicamptina), BAY 38-3441, 9-nitrocampotecina (Oreticina, rubitecán), exatecán (DX-8951), lurtotecano (GI-147211 C), gimitecán, diflomotecán de homocampotecinas (BN-80915) y 9-aminocampotecina (IDEC-13'), SN-38, ST1481, karanitecina (BNP1350), indolocarbazoles (por ejemplo, NB-506), protoberberinas, intoplicinas, idenoisoquinolonas, benzofenacinas o NB

45 506.

En otra realización relacionada, la invención contempla la práctica del método en combinación con otras terapias antitumorales tales como la radiación. Como se usa en la presente memoria, el término "radiación" pretende incluir cualquier tratamiento de una célula neoplásica o someter a fotones, neutrones, electrones u otro tipo de radiación

50 ionizante. Tales radiaciones incluyen, pero sin limitación, rayos X, radiación gamma o partículas de iones pesados tales como partículas alfa o beta. Además, la radiación puede ser radioactiva. Los medios para irradiar células neoplásicas en un sujeto son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, terapia de haz externo y braquiterapia.

Los métodos para determinar si se ha tratado un cáncer (tumor o neoplasia) son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, una disminución del número de células tumorales (por ejemplo, una disminución de la proliferación celular o una disminución del tamaño del tumor). Se reconoce que el tratamiento de la presente invención puede ser una respuesta completa y duradera o puede abarcar una respuesta clínica parcial o transitoria. Véase, por ejemplo, Isselbacher *et al.* (1996), "Harrison's Principles of Internal Medicine" 13 ed., 1814-1882,

60 incorporado en la presente memoria por referencia.

Los ensayos para analizar la sensibilización o el aumento de muerte de las células tumorales son bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los ensayos estándar de respuesta a la dosis para evaluar la viabilidad celular; la electroforesis en gel de agarosa de extracciones de ADN o la citometría de flujo para determinar la fragmentación del ADN, una característica de la muerte celular; los ensayos que miden la actividad de los polipéptidos implicados en la apoptosis; y el ensayo de los signos morfológicos de muerte celular. Los detalles con respecto a tales ensayos

se describen en otra parte de la presente memoria. Otros ensayos incluyen ensayos de cromatina (por ejemplo, recuento de la frecuencia de la cromatina nuclear condensada) o los ensayos de resistencia a fármacos como los descritos, por ejemplo, en Lowe *et al.*, (1993) *Cell* 74:95 7-697, incorporados en la presente memoria por referencia.

## 5 Composiciones farmacéuticas

Se puede determinar el perfil de los posibles agentes terapéuticos con el fin de determinar su idoneidad para ser incluidos en una composición farmacéutica. Una medida común para tales agentes es el índice terapéutico, que es la relación entre la dosis terapéutica y una dosis tóxica. Los umbrales para la dosis terapéutica (eficacia) y la dosis tóxica se pueden ajustar según sea apropiado (por ejemplo, la necesidad de una respuesta terapéutica o la necesidad de minimizar una respuesta tóxica). Por ejemplo, una dosis terapéutica puede ser la cantidad terapéuticamente eficaz de un agente (en relación con el tratamiento de una o más afecciones) y una dosis tóxica puede ser una dosis que provoque la muerte (por ejemplo, una  $DL_{50}$ ) o provoque un efecto no deseado en una proporción de la población tratada. Preferiblemente, el índice terapéutico de un agente es de al menos 2, más preferiblemente de al menos 5, e incluso más preferiblemente de al menos 10. El perfil de un agente terapéutico también puede incluir la medición de la farmacocinética del agente para determinar su biodisponibilidad y/o absorción cuando se administra en diversas formulaciones y/o a través de diversas vías.

Un compuesto de la presente invención se puede administrar a un individuo en necesidad del mismo. En ciertas realizaciones, el individuo es un mamífero tal como un ser humano o un mamífero no humano. Cuando se administra a un individuo, el compuesto de la invención se puede administrar como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, el compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas tales como agua o solución salina fisiológicamente tamponada, u otros disolventes o vehículos tales como glicoles, glicerol, aceites tales como aceite de oliva o ésteres orgánicos inyectables. En una realización preferida, cuando dichas composiciones farmacéuticas son para la administración humana, la solución acuosa está libre de pirógenos o sustancialmente libre de pirógenos. Los excipientes se pueden seleccionar, por ejemplo, para efectuar la liberación retardada de un agente o para dirigirse selectivamente a una o más células, tejidos u órganos.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede contener agentes fisiológicamente aceptables que actúen, por ejemplo, para estabilizar o para aumentar la absorción de un compuesto tal como erastina o un inhibidor de la tubulina. Tales agentes fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, carbohidratos tales como glucosa, sacarosa o dextranos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o glutatona; agentes quelantes; proteínas de bajo peso molecular, u otros estabilizantes o excipientes. La elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable, que incluye un agente fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de la vía de administración de la composición. La composición farmacéutica (preparación) también puede ser un liposoma u otra matriz polimérica que puede tener incorporado, por ejemplo, un compuesto de la invención. Los liposomas, por ejemplo, que consisten en fosfolípidos u otros lípidos, son vehículos no tóxicos, fisiológicamente aceptables y metabolizables que son relativamente fáciles de preparar y administrar.

Una composición farmacéutica (preparación) que contiene un compuesto de la invención se puede administrar a un sujeto por cualquiera de una serie de vías de administración incluyendo, por ejemplo, la vía oral, vía intramuscular, vía intravenosa, vía anal, vía vaginal, vía parenteral, vía nasal, vía intraperitoneal, vía subcutánea y vía tópica. La composición se puede administrar por inyección o por incubación.

En ciertas realizaciones, el compuesto (por ejemplo, la erastina) de la presente invención se puede usar solo o administrado junto con otro tipo de agente terapéutico antitumoral. Como se usa en la presente memoria, la expresión "administración conjunta" se refiere a cualquier forma de administración en combinación de dos o más compuestos terapéuticos diferentes, de modo que el segundo compuesto se administra mientras el compuesto terapéutico administrado previamente sigue siendo eficaz en el cuerpo (por ejemplo, los dos compuestos son simultáneamente eficaces en el paciente, lo que puede incluir los efectos sinérgicos de ambos compuestos). Por ejemplo, los compuestos terapéuticos diferentes se pueden administrar ya sea en la misma formulación o en una formulación separada, bien concomitante o secuencialmente. Así pues, un individuo que recibe tal tratamiento puede beneficiarse de un efecto combinado de diferentes compuestos terapéuticos.

Se contempla que el compuesto (por ejemplo, la erastina) de la presente invención se administra a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, preferiblemente un ser humano) en una cantidad (dosis) terapéuticamente eficaz. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende la concentración de un compuesto que es suficiente para producir el efecto terapéutico deseado (por ejemplo, el tratamiento de una afección, la muerte de una célula neoplásica). En general, se entiende que la cantidad eficaz del compuesto variará de acuerdo con el peso, el sexo, la edad y el historial médico del sujeto. Otros factores que influyen en la cantidad eficaz pueden incluir, pero sin limitación, la gravedad de la afección del paciente, el trastorno a tratar, la estabilidad del compuesto y, si se desea, otro tipo de agente terapéutico que se administre con el compuesto de la invención. Típicamente, para un sujeto humano, una cantidad eficaz variará de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Se puede administrar una dosis total mayor mediante múltiples administraciones del agente. Los métodos para determinar la eficacia y la dosis son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Isselbacher



*et al.* (1996) "Harrison's Principles of Internal Medicine", 13 ed., 1814-1882.

### **Ejemplificación**

5 La invención descrita de forma general se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente a efectos ilustrativos de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la misma.

10 Solo los ejemplos que pertenecen a las reivindicaciones son ejemplos de acuerdo con la invención.

#### **EJEMPLO 1. Identificación de compuestos con mayor potencia o actividad en presencia de determinados alelos relacionados con el cáncer**

15 En el presente apartado, se describe el trabajo llevado a cabo para identificar los compuestos con una mayor potencia o actividad en presencia de *hTERT*, *LT*, *ST*, *E6*, *E7* or *RAS<sup>V12</sup>*. Aunque el trabajo descrito en la presente memoria hace uso de *hTERT*, *LT*, *ST*, *E6*, *E7* y *RAS<sup>V12</sup>* como genes transformantes, los futuros estudios pueden hacer uso de una amplia variedad de alelos asociados con el cáncer mediante la presente metodología para definir las redes de señalización que implican muchos oncogenes y supresores tumorales. Se usaron líneas celulares manipuladas genéticamente con estos elementos genéticos para rastrear 23.550 compuestos, incluyendo 20.000  
20 compuestos de una biblioteca combinatoria, 1.990 compuestos procedentes de la colección de diversidad del National Cancer Institute y 1.540 compuestos biológicamente activos conocidos seleccionados y adquiridos por el solicitante, y que se formatearon en una colección rastreable. El rastreo primario analizó (por cuadruplicado) el efecto de tratar células tumorigénicas manipuladas genéticamente BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> con cada compuesto durante 48 horas a una concentración de 4 µg/ml correspondiente a 10 µM para un compuesto con un peso molecular de 400, que es el peso molecular medio aproximado de las bibliotecas. Se midió la viabilidad celular con el  
25 uso del colorante acetoximetiléster de calceína (AM de calceína) (Wang *et al.*, 1993, *Hum. Immunol.* 37, 264-270), que es un compuesto no fluorescente que se difunde libremente en las células. En las células vivas, el AM de calceína es escindido por las esterasas intracelulares, formando el derivado aniónico de calceína fluorescente, que no puede difundirse fuera de las células vivas. Por lo tanto, las células vivas muestran una fluorescencia verde cuando se incuban con AM de calceína, mientras que las células muertas no lo hacen. Los compuestos que mostraron una inhibición del 50% o superior de la tinción con el colorante de viabilidad AM de calceína en células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> se analizaron posteriormente en una serie de diluciones dobles en células BJ y BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> para identificar compuestos que muestran letalidad sintética, que es letalidad en las células tumorales pero no en las células primarias isogénicas. Se calculó el valor de  $CI_{50}$  (concentración necesaria para inhibir el 50% de la señal del AM de calceína) para cada compuesto en cada línea celular (Tabla 1). Esto resultó en la identificación de nueve compuestos (Figura 2) que eran al menos cuatro veces más potentes en células tumorigénicas BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> que en células primarias BJ (compuestos para los que al menos se requiere una concentración cuatro veces superior en células primarias BJ con el fin de obtener la misma inhibición del 50% de la señal del AM de calceína). A continuación, se presenta un análisis más detallado de estos nueve compuestos.

30 Tres de estos compuestos (doxorubicina, daunorrubicina y mitoxantrona) se usan clínicamente en la actualidad como fármacos contra el cáncer, uno (la camptotecina) es un producto análogo natural de fármacos contra el cáncer usados clínicamente (topotecán e irinotecán) y uno (la equinomicina) se probó recientemente en ensayos clínicos de fase II. Los nueve compuestos se probaron por duplicado a múltiples dosis en cada panel de células manipuladas genéticamente para confirmar que las selectividades observadas se vieran en múltiples líneas celulares derivadas de forma independiente (Figura 1 y Tabla 1).

35 Los solicitantes desarrollaron una métrica de selectividad que mide el cambio en la  $CI_{50}$  (concentración necesaria para obtener un 50% de inhibición de la señal de viabilidad) de un compuesto en dos líneas celulares diferentes. Para calcular esta puntuación de la selectividad entre dos líneas celulares, se divide la  $CI_{50}$  para un compuesto en una línea celular entre la  $CI_{50}$  para el mismo compuesto en una segunda línea celular. Así pues, un compuesto que se debe usar a una concentración cuatro veces superior en una línea celular con respecto a una segunda línea celular tendría una puntuación de selectividad de 4. Se calculó la "puntuación de la selectividad tumoral" para cada compuesto, dividiendo el valor de  $CI_{50}$  para el compuesto en las células BJ primarias parentales entre el valor de  $CI_{50}$   
40 para el compuesto en células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> manipuladas genéticamente que contenían los cuatro elementos genéticos necesarios para crear células tumorales (Tabla 1).

45 Estas células tumorigénicas manipuladas genéticamente hacen uso de oncoproteínas virales que actúan de manera dominante tales como *LT*, *ST*, *E6* y *E7*. Estas proteínas virales posiblemente están implicadas en la transformación celular en formas específicas del cáncer, concretamente, mesotelioma maligno inducido por el virus del simio 40 (Testa y Giordano, 2001, *Semin Cancer Biol.* 77, 31-8) y carcinoma cervical inducido por el virus del papiloma humano (Bosch *et al.*, 2002, *J Clin Pathol* 55, 244-65), y se han usado para interrumpir la función de p53 y pRB para transformar células *in vitro* e *in vivo* (Elenbaas *et al.*, 2001, *Genes Dev.* 15, 50-65; Jorcyk *et al.*, 1998, *Prostate* 34, 10-22; Perez-Stable *et al.*, 1997, *Cancer Res* 57, 900-6; Rich *et al.*, 2001, *Cancer Res* 61, 3556-60; Sandmoller *et al.*, 1995, *Cell Growth Differ* 6, 97-103). Los solicitantes hicieron uso de estos dos métodos diferentes para la desactivación de las proteínas celulares (probaron los efectos de la desactivación de pRB y p53 basada tanto en *LT*  
50

como en E6/E7) con el fin de controlar los efectos idiosincrásicos que se podrían observar con una proteína viral específica. También se confirmó la selectividad de estos compuestos en una línea celular que expresa inhibidores negativos dominantes de p53 y pRB que no derivan de elementos virales. Esta línea celular expresa (i) una forma truncada de p53 (p53DD) que interrumpe la tetramerización de p53 endógena, (ii) un mutante CDK4<sup>R24C</sup> resistente a la inhibición por p16<sup>INK4A</sup> y p15<sup>INK4B</sup> (los principales reguladores negativos de CDK4) y (iii) ciclina D1. Los efectos de los nueve compuestos selectivos del genotipo se analizaron a un intervalo de concentraciones en estas células, que se conocen como células BJ-TERT/p53DD/CDK4<sup>R24C</sup>/D1/ST/RAS<sup>V12</sup> (Tabla 1). Los resultados mostraron que hubo una reducción global moderada de la actividad de todos los compuestos cuando se probaron en estas células. Sin embargo, los resultados globales de los análisis no se modificaron por el uso de proteínas no virales en esta línea celular (Tabla 1).

## EJEMPLO 2. Determinación de la base genética de la selectividad de los compuestos

Los solicitantes buscaron determinar la base genética de la selectividad para cada compuesto. Es decir, se intentó definir para cada compuesto, el gen o la combinación de genes responsables de convertir las células en sensibles al compuesto (Tabla 1). Los resultados mostraron que estos nueve compuestos podrían clasificarse en tres grupos, concretamente, (i) compuestos que no muestran selectividad genética simple, (ii) los compuestos que muestran selectividad por las células que albergan TERT y RB inactivo, y (iii) los compuestos que requirieron la presencia tanto de RAS oncogénica como de ST para mostrar letalidad.

Los compuestos del grupo (i), sangivamicina, buvardina, NSC 146109 y equinomicina, no tienen una base genética clara para su selectividad hacia células tumorigénicas. Por ejemplo, la equinomicina se vuelve algo más activa a medida que se va introduciendo cada elemento genético (Figura 3a). Los solicitantes han observado que la tasa de proliferación celular aumenta al introducir uno de estos elementos genéticos. Por lo tanto, es probable que los compuestos del grupo (i) sean simplemente selectivos por las células de división rápida. Como apoyo a esta interpretación está el hecho de que se ha publicado que todos estos compuestos actúan mediante la inhibición de la síntesis del ADN o de proteínas, siendo esto más necesario en células de rápida división. Por ejemplo, se informa de que la equinomicina funciona como un bis-intercalador del ADN (Van Dyke y Dervan, 1984, *Science* 225, 1122-7; Waring y Wakelin, 1974, *Nature*, 252, 653-7), se informa que la buvardina funciona como un inhibidor de la síntesis de proteínas (Zalacain *et al.*, 1982, *FEBS Lett* 148, 95-7), la sangivamicina es un análogo de nucleótido (Rao, 1968, *J. Med. Chem.*, 11, 939-41) y NSC146109 se asemeja estructuralmente a un intercalador de ADN (Figura 2). Cabe señalar que se ha informado que la sangivamicina funciona como un inhibidor de PKC (Loomis y Bell, 1988, *J. Biol. Chem.* 263, 1682-1692), aunque esta actividad parece poco probable que sea relevante en el presente contexto, debido a que otros inhibidores de PKC no mostraron selectividad en este sistema. Los solicitantes fueron capaces de identificar compuestos que son simplemente más activos en células de división rápida, tales como estos compuestos del grupo (i) debido a que no muestran ninguna base genética clara de la selectividad. No se trabajó más con estos compuestos. Así pues, fue posible enfocar los estudios mecanísticos en los compuestos de los grupos (ii) y (iii) que mostraron selectividad.

Los compuestos del grupo (ii), la mitoxantrona, doxorubicina y daunorrubicina, son venenos de topoisomerasa II que se unen a la topoisomerasa II y al ADN, y evitan que los fragmentos del ADN de doble cadena introducidos por la topoisomerasa II se vuelvan a ligar. También se ha informado que estos compuestos y las antraciclinas en general, inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en algunos tipos de células (Laurent y Jaffrezou, 2001, *Blood* 98, 913-24; Muller *et al.*, 1998, *Int J Mol Med* 1, 491-4; Richard *et al.*, 2002, *Leuk Res* 26, 927-31), aunque los solicitantes no observaron la formación de ROS en estas células artificiales en presencia de estos tres compuestos. Se descubrió que estos compuestos se vuelven más potentes (activos a una concentración inferior) cuando se introduce *hTERT* y, de nuevo, cuando RB se desactiva por la introducción de LT o E7 del VPH. En las células, E7 se introdujo después de E6, por lo que es posible que el aumento de potencia de estos compuestos en las células que albergan E7 también se base en la presencia de E6, aunque E6 por sí solo no confiere una mayor potencia a estos compuestos. La introducción de *hTERT* y la desactivación de RB provocó un aumento en la expresión de la topoisomerasa II $\alpha$  (Figura 5A) y solo un aumento muy moderado de la expresión de la topoisomerasa II $\alpha$ . La introducción de RAS oncogénico causa un aumento adicional en la expresión de la topoisomerasa II $\alpha$ , aunque los solicitantes no observaron una mayor sensibilización a los venenos de topoisomerasa II en presencia de RAS oncogénico (Figura 5A).

Los compuestos del grupo (iii) son la camptotecina (CPT) y un nuevo compuesto de una biblioteca combinatoria que los solicitantes han denominado erastina, como erradicador de células que expresan RAS y ST (Figura 2). La muerte celular eficiente inducida por la CPT e inducida por la erastina requiere la presencia tanto de ST como de RAS<sup>V12</sup> (Figuras 3 y 4 y Tabla 1). Aunque la CPT y la erastina tienen una base genética de la selectividad similar, tienen mecanismos de acción distintos. La CPT es parcialmente activa en células que carecen de la función RB (a través de la expresión de E7), mientras que la erastina no, y la CPT necesita dos días para provocar la muerte de las células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup>, mientras que la erastina es un 100% eficaz en un plazo 18 horas (Figuras 3 y 4). El inhibidor de fosfatasa ácido ocaidaico fue capaz de sensibilizar de otra manera a las células primarias BJ resistentes a la CPT (Figura 5E), posiblemente debido a que el ácido ocaidaico sobreexpone a la TOP1 (Figura 5F). El ácido ocaidaico no vuelve a las células BJ o BJ-TERT sensibles a la erastina, coincidiendo con un modelo en el que la CPT y la erastina actúan a través de mecanismos distintos. Además, los solicitantes descubrieron que el compuesto letal

podofilotoxina, un inhibidor de la tubulina, no sensibiliza las células BJ o BJ-TERT hacia la CPT, lo que confirma que la sensibilización de las células BJ hacia la CPT mediante el ácido ocadaico es específica y no el resultado de dos estímulos débiles de muerte celular que tienen un efecto aditivo, pero funcionalmente irrelevante.

- 5 En un intento por comprender la base molecular del aumento de la sensibilidad hacia la CPT de las células que expresan RAS<sup>V12</sup> y ST, los solicitantes determinaron el nivel de expresión en las células manipuladas genéticamente de la topoisomerasa I (TOPI), la diana putativa de la CPT (Andoh *et al.*, 1987, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 84, 5565-9; Bjornsti *et al.*, 1989, *Cancer Res* 49, 6318-23; Champoux, 2000, *Ann N Y Acad Sci* 922, 56-64; D'Arpa *et al.*, 1990, *Cancer Res* 50, 6919-24; Eng *et al.*, 1988, *Mol Pharmacol* 34, 755-60; Hsiang *et al.*, 1989, *Cancer Res* 49, 5077-82; Hsiang y Liu, 1988, *Cancer Res* 48, 1722-6; Liu *et al.*, 2000, *Ann N Y Acad Sci* 922, 1-10; Madden y Champoux, 1992, *Cancer Res* 52, 525-32; Tsao *et al.*, 1993, *Cancer Res* 53, 5908-14). Se descubrió que las células que expresan tanto RAS<sup>V12</sup> como ST sobrerregulan TOP1 (Figura 5B). Como el supuesto mecanismo de acción de la CPT en otros tipos de células implica una ganancia de función, en concreto, la introducción de roturas de cadenas dobles de ADN de una manera dependiente de TOP1 (Liu *et al.*, 2000, *Ann NY Acad Sci* 922, 1-10), la sobrerregulación de TOP1 podría explicar el aumento de sensibilidad de las células que expresan RAS<sup>V12</sup> y ST hacia la CPT. En apoyo de esta interpretación, se descubrió que la desactivación genética de TOP1 con un ARN de interferencia pequeño (siARN) en células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> confiere resistencia parcial a la CPT (Figura 5 C, D).
- 10
- 15
- 20 Los solicitantes analizaron además la actividad y la selectividad en células tumorales frente a las células normales de otros análogos de erastina. Se identificó otro compuesto análogo como activo y selectivo, pero menos potente que la erastina. Este compuesto se denominó erastina B (véase la Figura 8). Las células BJELR son células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup>, y BJEH son células BJ-TERT.
- 25 Otros compuestos probados tanto en células BJELR como en células BJEH son los siguientes:

### EJEMPLO 3. Caracterización de la muerte celular

30 Los solicitantes buscaron caracterizar el tipo de muerte celular inducida por la CPT y la erastina en BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> tumorigénicas. En otros contextos, se ha descubierto que la CPT induce la muerte celular apoptótica (Traganos *et al.*, 1996, *Ann NY Acad Sci* 803, 101-10), que se caracteriza por alteraciones en la morfología nuclear, incluyendo la picnosis, la cariorhexis y/o la marginación de los cromatina (Majno y Joris, 1995, *Am J Pathol* 146, 3-15). Para determinar si la erastina o la CPT inducen la apoptosis en su sistema, los solicitantes hicieron un seguimiento de la morfología nuclear de células tumorigénicas tratadas con CPT y erastina mediante microscopía de fluorescencia. Aunque la cariorhexis y la marginación de la cromatina fueron claramente visibles en las células tratadas con CPT, no se observó tal alternancia morfológica en las células tratadas con erastina (Figura 7A). Puesto que es necesario que se produzca el cambio morfológico del núcleo de las células apoptóticas, los solicitantes concluyen que la muerte celular inducida por la erastina no es apoptótica. Como apoyo a esta conclusión, están las observaciones de que la CPT, y no la erastina, induce la fragmentación del ADN (que es la formación de una escalera de ADN), que un inhibidor de pan-caspasa (Boc-Asp(OMe)-fluorometilcetona 50 µM, Sigma # B2682 (Chan *et al.*, 2001, *Neuroreport* 12, 541-545)) bloqueó parcialmente la muerte celular inducida por la CPT, pero no por la erastina, y que la CPT, y no la erastina, provocó un aumento de la tinción con anexina V (Figura 7B) y la aparición de caspasa 3 activa escindida (Figura 7C). Además, los núcleos se mantuvieron intactos en las células tumorales tratadas con erastina (Figura 9).

35

40

45

La capacidad de la erastina para inducir la muerte celular no apoptótica es selectiva de las células que expresan ST y RAS<sup>V12</sup>. Los tratamientos más prolongados y las mayores concentraciones de erastina tuvieron poco efecto en la viabilidad de las células que carecían de RAS<sup>V12</sup> o ST, confirmando la naturaleza cualitativa de la selectividad de la erastina (Figura 6A, C). Como las células tratadas con erastina no sufren apoptosis, los solicitantes buscaron confirmar que la erastina induce realmente la muerte celular, en lugar de la separación de las células. Se cuantificó la viabilidad celular en presencia de erastina usando azul Alamar (Ahmed *et al.*, 1994, *J. Immunol. Methods* 170, 211-224), un colorante de viabilidad que mide el potencial reductor intracelular. La erastina presentó letalidad selectiva en células tumorigénicas BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> en relación con las células BJ-TERT en este ensayo de viabilidad con azul Alamar homogéneo (Figura 6B). Las células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> tratadas con erastina durante 18 horas se redondearon y se separaron (Figura 6C), no excluyeron el colorante vital azul de tripano, mostraron una pérdida del potencial de la membrana mitocondrial analizado mediante el colorante potenciométrico JC-1 y adquirieron un pequeño tamaño celular característico de las células muertas. Los solicitantes determinaron que la pérdida de viabilidad inducida por la erastina es irreversible una vez completada, en tanto en cuanto las células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> tratadas con erastina durante 24 horas se redondearon, se separaron y no pudieron recuperarse cuando se volvieron a sembrar en medio libre de erastina. Así pues, la erastina induce una muerte celular rápida (12-24 h), irreversible y no apoptótica de una manera dependiente de ST- y RAS<sup>V12</sup>.

50

55

60

Se realizaron otros estudios adicionales que demostraron que la erastina induce la formación de especies reactivas de oxígeno (véase la Figura 10).

65

Se llevaron a cabo rastreos en busca de supresores (inhibidores) de la actividad de la erastina. Se identificaron cuatro antioxidantes que suprimen la actividad de la erastina, uno de los cuales fue el antioxidante  $\alpha$ -tocoferol.

En los ejemplos descritos en la presente memoria se usaron los siguientes métodos y materiales.

5

### Construcciones y retrovirus

Se usaron las construcciones de expresión para hTERT, LT, ST, región temprana de SV40 y HRAS<sup>V12</sup> según lo descrito previamente (Hahn *et al.*, 1999, *supra*; Hahn *et al.*, 2002, *supra*). hTERT-pWZL-Blast $\epsilon$ , E6-pWZL-zeo $\epsilon$  y E6E7-pWZL,-Zeo $\epsilon$  se han descrito anteriormente (Lessnick *et al.*, 2002, *supra*). Se clonaron los ADN de E6 y LT en el vector retroviral pWZL-Hygro $\epsilon$  (concedido amablemente por J. Morgenstern, Millenium Pharmaceuticals). Se prepararon retrovirus de pseudotipo glucoproteína G del virus de la estomatitis vesicular y se llevaron a cabo infecciones según lo descrito anteriormente (Lessnick *et al.*, 2002, *supra*).

10

### 15 Líneas celulares

Se prepararon fibroblastos primarios de TIP5 (Lessnick *et al.*, 2002, *supra*) de prepucios neonatales desechados y se immortalizaron mediante la infección con retrovirus hTERT-pWZL-BLAST $\epsilon$  o hTERT-pBabe-hygro y la selección bien con blasticidina o higromicina, respectivamente. Las células BJ células fueron un obsequio de Jim Smith. Se infectaron los fibroblastos immortalizados con hTERT con los retrovirus indicados y se seleccionaron para los marcadores apropiados. Todos los derivados de BJ se cultivaron en una mezcla 1:1 de DMEM y M199 suplementado con suero fetal bovino desactivado al 15%, penicilina y estreptomina (pen/etrep). Se cultivaron las células TIP5 en DMEM que contenía FBS al 10% y penicilina/estreptomina. Todos los cultivos celulares se incubaron a 37 °C en una incubadora humidificada que contenía CO<sub>2</sub> al 5%

20

25

### Bibliotecas de compuestos

Se usaron una biblioteca de compuestos anotados (ACL) que comprendía 1.540 compuestos, un conjunto de diversidad del NCI de 1.990 compuestos obtenido en el Instituto Nacional del Cáncer y una biblioteca combinatoria (ComGenex International, Inc.) que contenía 20.000 compuestos en los rastreos letales sintéticos selectivos de tumores. Todas las bibliotecas de compuestos se prepararon como soluciones de 4 mg/ml en DMSO en placas de polipropileno de 384 pocillos (columnas 3-22) y se almacenaron a -20 °C. La camptotecina (N° de cat. C9911, PM: 348,4), la doxorubicina (N° de cat. D1515 PM: 580,0), la daunorubicina (N° de cat. D8809, PM: 564,0), la mitoxantrona (N° de cat. M6545, PM: 517,4), el ácido ocaidaico (N° de cat. 04511, PM: 805,0), la equinomicina (N° de cat. E4392, PM: 1101) y la sangivamicina (N° de cat. S5895, PM: 309,3) se obtuvieron en Sigma-Aldrich Co. La buvardina (PM: 772,84) y NSC146109 (PM: 280,39) se obtuvieron del Programa de Desarrollo Terapéutico del Instituto Nacional del Cáncer. La erastina (PM: 545,07) se obtuvo de ComGenex International, Inc.

30

35

### 40 Ensayo de viabilidad con AM de calceína

El acetoximiltiléster (AM) de calceína es compuesto no fluorescente permeable a través de la membrana celular que es escindido por las esterasas intracelulares para formar el compuesto aniónico, impermeable a las células fluorescente calceína. Las células viables se tiñen con la calceína debido a la presencia de esterasas intracelulares y porque la membrana plasmática intacta evita que la calceína fluorescente se escape de las células (Wang *et al.*, 1993, *supra*). Se sembraron las células en placas de 384 pocillos usando un SciClone ALH de Zymark, se trataron con cada compuesto por triplicado a 4  $\mu$ g/ml en el rastreo principal durante dos días, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato en un Minitrak de Packard con un lavador de 384 pocillos y se incubaron durante cuatro horas con 0,7  $\mu$ g/ml de calceína (Molecular Probes). Se registró la intensidad total de fluorescencia en cada pocillo en un lector de placas Packard Fusion, y se convirtieron en un porcentaje de inhibición de la señal restando el fondo instrumental y dividiendo entre la señal media obtenida cuando las células no se trataron con ningún compuesto.

40

45

50

### Ensayo de viabilidad con azul Alamar

El azul Alamar es reducido por la actividad de las enzimas mitocondriales en células viables, causando cambios tanto colorimétricos como fluorescentes (Nociari *et al.*, 1998, *J. Immunol. Methods* 13, 157-167). Se sembraron las células a una densidad de 6.000 células (50  $\mu$ l) por pocillo en una placa negra de fondo transparente de 384 pocillos usando un dispensador a granel de jeringas (Zymark). Se retiraron 10  $\mu$ l de una placa de erastina diluida en serie dos veces (6 x la concentración final) usando una cabeza de 384 cánulas fijas, por lo que la concentración final fue de 20  $\mu$ g/ml en el pocillo con la concentración más alta. Se incubaron las placas durante 24 horas. Se añadió azul Alamar (Biosource International) a cada pocillo por dilución 1:10 y se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Se determinó la intensidad de fluorescencia usando un lector de placas Packard Fusion con un filtro de excitación centrado en 535 nm y un filtro de emisión centrado en 590 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición medio para cada concentración. Las barras de error indican una desviación estándar. El ensayo de azul Alamar no implica lavar las células.

60

65

**Rastreo**

Se prepararon placas de réplica con un ALH SciClone de Zymark y Twister II integrado mediante la dilución de placas madre 50 veces en medio que carecía de suero y penicilina/estreptomicina para obtener una concentración del compuesto en las placas de réplica de 80 µg/ml con DMSO al 2%. Las placas de ensayo se prepararon mediante la siembra de células en placas negras de fondo transparente de 384 pocillos en las columnas 1 a 23 (6.000 células/pocillo en 57 µl) usando un dispensador a granel de jeringas. Las columnas 3-22 se trataron con compuestos de una placa de réplica de la biblioteca mediante la transferencia de 3 µl de la placa de réplica de la biblioteca usando una disposición de cánulas fijas de 384 posiciones. Por tanto, las concentraciones de los compuestos finales en las placas de ensayo fueron de 4 µg/ml. Se incubaron las placas de ensayo durante 48 horas a 37 °C en una incubadora humidificada que contenía CO<sub>2</sub> al 5%. Se realizó el procesado de las placas para el ensayo de viabilidad con AM de calceína con un sistema robótico integrado de Minitrak/Sidetrak Packard Bioscience (Perkin Elmer). Se lavaron las placas de ensayo con solución salina tamponada con fosfato y se añadieron 20 µl de AM de calceína (0,7 µg/ml) por pocillo. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 4 horas. Se determinó la intensidad de fluorescencia usando un lector de placas Fusion con filtros centrados en una excitación de 485 nm y una emisión de 535 nm.

**Repetición del análisis de los compuestos en una serie de dilución**

Los compuestos para repetir el análisis se adquirieron de los fabricantes. Se prepararon soluciones madre en DMSO a una concentración de 1 mg/ml en placas de polipropileno de 384 pocillos y con una curva de dosis a una dilución del doble de 16 puntos de cada compuesto en una columna por duplicado. Las columnas 1-2 y 23-24 se dejaron vacías para los controles. Las placas de replica de repetición del análisis se prepararon a partir de la placa madre de repetición del análisis mediante la dilución 66,6 veces en DMEM en placas de 384 pocillos profundos (transferencia de 4,5 µl a 300 µl). Se sembraron las células a una densidad de 6.000 por pocillo en 40 µl y se añadieron 20 µl de una placa de réplica de repetición del análisis. Se incubaron las placas durante dos días a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5%.

**Análisis de los datos**

Se calcularon las UFR (unidades de fluorescencia relativa) de las células no tratadas promediando las columnas 1, 2 y 23 (pocillos con células pero que carecían de compuestos). El fondo de la calceína se calculó promediando la columna 24 (pocillos con calceína, pero carentes de células). Se calculó el porcentaje de inhibición de cada pocillo como  $[1 - (\text{UFR} - \text{control de calceína}) / (\text{célula no tratada} - \text{control de calceína})] \times 100$ . Se analizó la selectividad por células tumorales manipuladas genéticamente BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V1</sup> de los compuestos que provocaron al menos una inhibición del 50% de la tinción con calceína en el rastreo principal mediante pruebas realizadas en células BJ primarias y BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> en un intervalo de concentraciones. Los compuestos selectivos se volvieron a analizar en todas las líneas celulares manipuladas genéticamente.

**Ensayo de morfología nuclear**

Se sembraron 200.000 células tumorigénicas BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> en 2 ml sobre cubreobjetos de vidrio en cada pocillo de una placa de seis pocillos, se trataron con nada (NT), erastina 9 µM o camptotecina 1,1 µM (CPT) en medio de crecimiento durante 18 horas mientras se incubaban a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5%. Se tiñeron los núcleos con 25 µg/ml de Hoechst 33342 (Molecular Probes) y se observaron con el uso de un objetivo de inmersión en aceite de 100 aumentos en un microscopio de fluorescencia.

**Mediciones del tamaño de las células**

Se sembraron 200.000 células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> en placas de seis pocillos en 2 ml de medio de cultivo solo (sin tratamiento), con erastina 9 µM o con camptotecina 1,1 µM (CPT). Tras 24 horas, se liberaron las células con tripsina/EDTA, se diluyeron hasta 10 ml en medio de crecimiento, y se determinó la distribución del tamaño celular de cada muestra en un contador Coulter.

**Ensayo de recuento celular para la actividad de la camptotecina**

Se sembraron células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> en placas de 6 pocillos (200.000 células/pocillo; 2 ml por pocillo) y se transfectaron en medio sin suero ni antibióticos usando Oligofectamine (Life Technologies), con siARN 100 nM por pocillo en un volumen total de un mililitro. Se añadieron 500 µl de medio que contenía SFB al 30% 4 horas después de la transfección. Se trataron las células con las concentraciones indicadas de camptotecina 30 horas después de la transfección. Se añadieron 500 µl de una solución x 5 de la concentración de camptotecina deseada a cada pocillo. Se retiraron las células con tripsina-EDTA y se contaron usando un hemocitómetro 75 horas después de la transfección. Los experimentos de control indicaron que la eficiencia de la transfección fue aproximadamente del 10%.

65

**Análisis de transferencia Western***Caspasa-3*

- 5 Antes del experimento, se sembraron células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> a  $5 \times 10^5$  células en placas de 60 mm. Se trataron las células con 5 µg/ml de erastina (9 µM) durante 2, 4, 6, 8 o 10 horas. Se mantuvo una placa durante el tratamiento con camptotecina (0,4 µg/ml durante 24 h) como control positivo. Se lisaron las células después de cada punto temporal en tampón de lisis (KOH de HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 40 nM, EDTA 2 mM, Triton X-100 al 0,5%, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaF 50 mM, pirofosfato sódico 10 mM, beta-glicerofosfato de sodio 10 mM y comprimido de inhibidor de proteasa (Roche)). Se cuantificó el contenido de proteína usando un reactivo de ensayo de proteínas BioRad. Las cantidades iguales de proteína se resolvieron en gel de poliacrilamida-SDS al 16%. Las proteínas sometidas a electroforesis fueron sometidas a una transferencia sobre una membrana de PVDF, se bloquearon con leche al 5% y se incubaron con anticuerpo policlonal contra la caspasa-3 activa (BD Pharmingen) a una dilución 1:1500 durante la noche a 4 °C. A continuación, se incubó la membrana en HRP anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology) en dilución 1:3000 durante 1 hora y se reveló con una mezcla de aumento de quimioluminiscencia (NEN Life Science, Renaissance). Para probar la carga equivalente en cada carril, se separaron las transferencias, se bloquearon y se sondaron con un anticuerpo anti-eIF-4E (BD Transduction Laboratories) a una dilución 1:1000.

*Topoisomerasa-IIa*

- 20 Se sembraron células BJ, BJ-TERT, BJ-TERT/LT/ST, BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup>, BJ-TERT/LT/RAS<sup>V12</sup> y BJ-TERT/LT/RAS<sup>V12</sup>/ST a  $1 \times 10^6$  células por placa en placas de 60 mm. Tras incubar durante una noche las células a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5%, se lisaron según lo descrito anteriormente, y se resolvieron las proteínas en un gel de poliacrilamida al 10%. Se incubó la membrana con anticuerpo monoclonal contra la topoisomerasa IIαp170 humana (TopoGEN) a una dilución 1:1000 durante una noche a 4 °C y después con HRP antimurina (Santa Cruz Biotechnology).

*Topoisomerasa I (TOP1)*

- 30 Se sintetizó siARN bicatenario de 21 nucleótidos dirigido contra la TOP1 (nucleótidos 2233-2255, numeración a partir del codón de inicio, N° de acceso del GenBank J03250) (Dharmacon, purificado y desalado/desprotegido) y se transfectó (100 nM) a células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> en placas de seis pocillos con oligofectamine (Life Technologies). Tras 75 horas, se lisaron las células y se determinó el nivel de expresión de TOP1 mediante transferencia Western (Topogen, N° de cat. 2012-2, dilución de 1:1000). Se determinó el nivel de carga de proteínas mediante la extracción y la repetición del sondeo de la misma transferencia con un anticuerpo dirigido contra eIF-4E (BD Biosciences, N° de Cat. 610270, dilución de 1:500). Alternativamente, se sembraron  $1 \times 10^6$  células en placas de 60 mm y se dejaron crecer durante una noche a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5%, luego se lisaron con 150 µl de tampón de lisis. Se retiraron las células con una espátula y se transfirieron a tubos de centrifugación y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se cuantificó el contenido de proteína de los lisados usando un reactivo de ensayo de estimación de proteínas Biorad. Se cargaron cantidades iguales de proteína en un gradiente del 10% de gel de poliacrilamida-SDS. Las proteínas sometidas a electroforesis fueron sometidas a una transferencia a una membrana de PVDF. Tras el bloqueo con leche en polvo al 5%, se incubó la membrana con anticuerpos murinos contra la topoisomerasa I humana (Pharmingen) durante una noche a 4 °C, luego con anticuerpo antimurino conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology).

**Ensayo de apoptosis con anexina V-FITC**

- 50 Se sembraron células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> a  $1 \times 10^6$  células por placa en placas de 100 mm y se dejaron crecer durante toda la noche. Se trataron las células con erastina (5 o 10 µg/ml) durante 6, 8 o 11 h. Se mantuvo un control tratado con camptotecina (0,4 µg/ml) que se trató en el momento de la siembra durante 20 horas. Después del tratamiento, se cosecharon las células con tripsina/EDTA y se lavaron una vez con medio fresco que contenía suero y luego dos veces con solución salina tamponada con fosfato. Se volvieron a suspender las células en tampón de unión x 1 (BD Pharmingen) a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Se incubaron 100 µl ( $1 \times 10^5$  células) con 5 µl de anexina V-FITC (BD Pharmingen) y yoduro de propidio (BD Pharmingen) durante 15 minutos a oscuras a temperatura ambiente. Luego se añadieron 400 µl del tampón de unión x 1 y se analizaron las células mediante citometría de flujo (Becton-Dickinson). Los datos se adquirieron y analizaron usando el software Cellquest. Solo las células viables que no se tiñeron con yoduro de propidio se analizaron para la tinción con anexina V-FITC usando el canal de FL1.

**60 Análisis de ROS: análisis de citometría de flujo usando H2DCF-DA**

- 65 El diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCF-DA) es un compuesto no fluorescente permeable a las células. La enzima esterasa endógena, en el interior de la célula, escinde la parte diacetato, y ya no puede salir fuera de la célula más. Por lo tanto, se acumula en la célula. Entonces H2DCF reacciona con ROS para formar diclorofluoresceno fluorescente (DCF), que se puede medir mediante citometría de flujo en el canal de FL1.

1. Se siembran las células a  $3 \times 10^5$  células por placa en placas de 60 mm y se dejan crecer durante la noche.
2. Se tratan con el compuesto de ensayo durante diferentes periodos de tiempo (1-10 h).
3. Se mantiene una placa para las células no tratadas, para la célula tratada con compuesto y la placa de control positivo (tratado con peróxido de hidrógeno) para cada punto temporal.
- 5 4. Se incuban las células con  $10 \mu\text{M}$  de H2DCF-DA durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ .
5. Para las células del control positivo, tras 5 minutos de carga de H2DCF-DA, se añaden  $500 \mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno y se incuban durante otros 5 minutos.
6. Se recoge la célula mediante tripsinización.
7. Se lava con PBS frío dos veces.
- 10 8. Se vuelven a suspender los sedimentos en  $100 \mu\text{l}$  de PBS y se transfieren a un tubo de FACS de 5 ml.
9. Se añaden  $5 \mu\text{l}$  de yoduro de propidio ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) y se incuban durante 10 minutos sobre hielo a oscuras.
10. Se añaden  $400 \mu\text{l}$  de PBS y se analiza mediante citometría de flujo (Becton-Dickinson).
11. Se obtienen los datos y se analizan mediante el programa informático CellQuest.
- 15 12. Solo se toman las células negativas en yoduro de propidio (células viables) para el análisis de la tinción con DCF usando el canal FL1, PI en el canal de FL3, se traza un gráfico de los cuadrantes

### Rastros de la biblioteca ACL de compuestos que pueden suprimir la actividad de la erastina en células BJELR

#### 20 *Método:*

La biblioteca ACL comprende 1.540 compuestos, y todos los compuestos se prepararon en DMSO a  $4 \mu\text{g/ml}$  en placas de polipropileno de 384 pocillos y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$ . Se prepararon placas de réplica para cada placa de la biblioteca usando Scilone ALH de Zymark. Se diluyeron las placas de réplica 50 veces en DMEM, siendo la concentración del compuesto de la placa de réplica de  $80 \mu\text{g/ml}$  con DMSO al 2%. En el ensayo, se diluye el compuesto de la placa de réplica 20 veces con suspensión de células, siendo por tanto la concentración final de cada compuesto de  $4 \mu\text{g/ml}$ .

30 Se sembraron las células BJELR a 6.000 células/pocillo ( $57 \mu\text{l}$ ) (en rastreo de cotratamiento) y 5.000 células/pocillo ( $57 \mu\text{l}$ ) (para el rastreo de pretratamiento) en placas negras de fondo transparente de 384 pocillos con dispensador de jeringas a granel. Para el rastreo de supresores de cotratamiento, se trataron las células con  $3 \mu\text{l}$  de compuesto de las placas de réplica de la biblioteca ACL (concentración final en la placa de ensayo a  $4 \mu\text{g/ml}$ ) y, al mismo tiempo, se trataron con  $5 \mu\text{g/ml}$  de erastina. La transferencia de los compuestos se hizo mediante una cabeza de 384 cánulas fijas. Se incubaron las placas durante 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora con  $\text{CO}_2$  al 5%. Para los rastros de pretratamiento, se incubaron las células previamente con el compuesto de la placa de biblioteca ACL de réplica durante una noche y después se trataron con  $5 \mu\text{g/ml}$  de erastina durante otras 48 horas. Se procesaron las placas para el análisis de calceína mediante el sistema robótico MiniTrak/SideTrak de Packard BioScience. Se lavaron las placas de ensayo con PBS y se incubaron con AM de calceína ( $0,7 \mu\text{g/ml}$ ) durante 4 horas a temperatura ambiente. Se determinó la intensidad de fluorescencia usando lector de placas Fusion con filtros centrados en una excitación de  $485 \text{ nm}$  y de emisión de  $535 \text{ nm}$ . Las células BJELR son células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup>.

45 La Tabla 1 muestra las potencias de los compuestos selectivos de tumores en líneas celulares manipuladas genéticamente. Se volvieron a analizar nueve compuestos selectivos de tumores en curvas de dosis a una dilución del doble de 16 puntos en todas las líneas celulares manipuladas genéticamente. La tabla muestra la concentración (en  $\mu\text{g/ml}$ ) necesaria para lograr un 50% de inhibición de la tinción con AM de calceína ( $\text{CI}_{50}$ ) para cada compuesto en cada línea celular. Se dividió la  $\text{CI}_{50}$  de células BJ primarias entre la  $\text{CI}_{50}$  de células tumorigénicas BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> para obtener una relación de selectividad tumoral para cada compuesto. La selectividad por un compuesto para cada elemento genético se determinó mediante el cálculo de la relación de selectividad para cada par subsiguiente de líneas celulares de una serie. Los compuestos selectivos de la oncoproteína T pequeña se consideraron selectivos de PP2A (la diana de la oncoproteína T pequeña), mientras que compuestos selectivos de E6 se consideraron selectivos de la pérdida de p53 y los compuestos selectivos de E7 se consideraron selectivos de la pérdida de RB.

	BJ	BJ-TERT	BJ-TERT/ LT/	BJ-TERT/ LT/	BJ-TERT/ LT/	BJ-TERT/ LT/	BJ-TERT/ LT/	BJ-TERT/ p53DD/	Selectividad tumoral	Base genética de la selectividad
			LT/	LT/	LT/	LT/	LT/	p53DD/		
			ST	ST/	Ras <sup>v12</sup>	Ras <sup>v12</sup> /	CDK4 <sup>R24C</sup> /			
				Ras <sup>v12</sup>		ST	ciclina D1/			
							ST/Ras <sup>v12</sup>			
Equinomicina	> 5	0,312	0,0048	0,0012	0,0048	0,0012	0,078	> 8333		inespecífica
Sangivamicina	0,312	0,039	0,195	0,078	0,078	0,078	0,078	4		inespecífica
NSC146109	> 5	5	2,5	2,5	5	2,5	5	> 4		inespecífica
Buvarcina	0,312	0,078	0,0195	0,078	0,078	0,0195	0,156	4		inespecífica
Mitoxantrona	5	1,25	0,312	0,312	1,25	0,312	1,25	16		TERT/RB
Doxorrubicina	> 5	1,25	0,312	1,25	1,25	1,25	1,25	> 8		TERT/RB
Daunorrubicina	5	1,25	0,312	0,312	1,25	0,625	0,625	16		TERT/RB
Camptotecina	> 5	> 5	1,25	0,0195	1,25	0,0195	1,25	> 512		Ras <sup>v12</sup> /PP2A/RB
<b>Erastina</b>	> 5	> 5	> 5	1,25	> 5	1,25	2,5	> 8		Ras <sup>v12</sup> /PP2A

	TIP5-TERT	TIP5-TERT/ LT	TIP5-TERT/ LT/	TIP5-TERT/ LT/	TIP5-TERT/ E6	TIP5-TERT/ E6E7	TIP5-TERT/ E6E7/	TIP5-TERT/ E6E7/
		LT	LT/	LT/	E6	E6E7	E6E7/	E6E7/
			ST	ST/			ST	ST/
				Ras <sup>v12</sup>				Ras <sup>v12</sup>
Equinomicina	> 5	5	0,0048	0,0024	> 5	0,048	0,048	0,0048
Sangivamicina	1,25	0,312	0,039	0,078	0,156	0,078	0,078	0,078
NSC146109	> 5	> 5	5	2,5	5	2,5	2,5	2,5
Buvarcina	> 5	0,312	0,039	0,039	0,078	0,039	0,039	0,078
Mitoxantrona	> 5	1,25	0,625	1,25	1,25	0,625	0,625	1,25
Doxorrubicina	> 5	1,25	0,625	0,625	5	1,25	1,25	1,25
Daunorrubicina	> 5	1,25	0,625	0,625	5	0,625	0,625	0,625
Camptotecina	> 5	> 5	0,156	0,156	> 5	0,625	0,156	0,156
<b>Erastina</b>	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	5

- 5 La Tabla 2 muestra las potencias de los compuestos con selectividad tumoral en líneas celulares manipuladas genéticamente. La tabla muestra la inhibición (valores de porcentaje negativo) o el aumento (valores de porcentaje positivo) de la tinción con AM de calceína (CI<sub>50</sub>) para cada compuesto en cada línea celular.

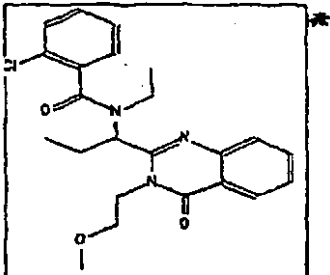


Tabla 2

Molécula

% medio de inhibición/aumento de células BJELR

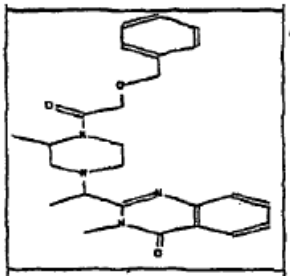
% medio de inhibición/aumento de células BJEH



no de acuerdo con la invención

-19%

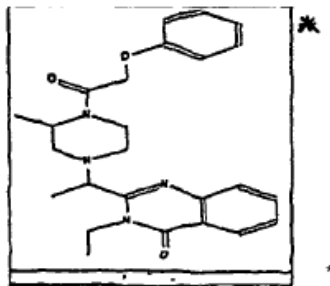
-1%



no de acuerdo con la invención

-41%

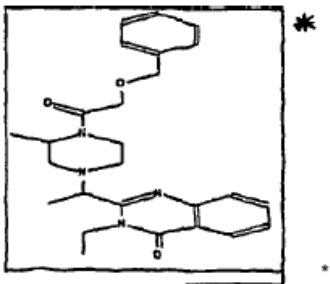
-10%



no de acuerdo con la invención

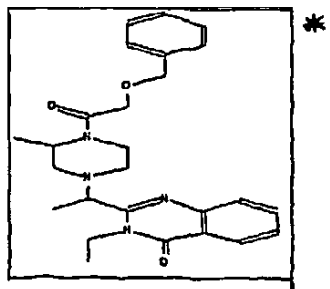
-6%

-9%



-15%

-1%



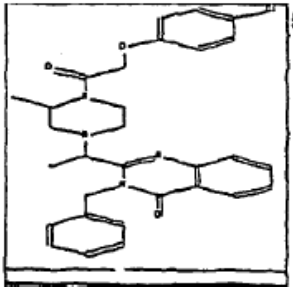
-41%

-7%

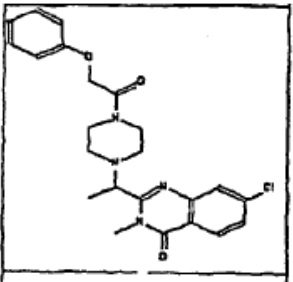
Molécula

% medio de inhibición/aumento de células BJELR

% medio de inhibición/aumento de células BJEH

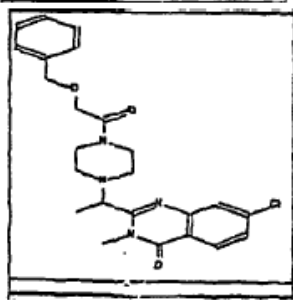


-28%



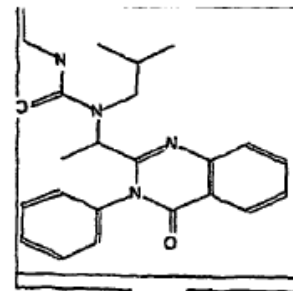
-31%

0%



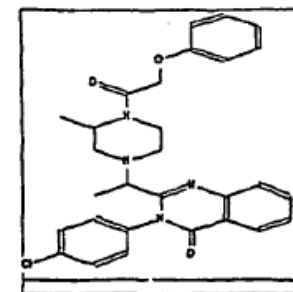
-29%

-1%



-26%

0%



-27%

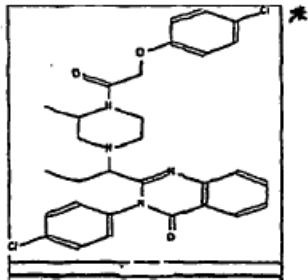
-2%

ES 2 409 686 T3

Molécula

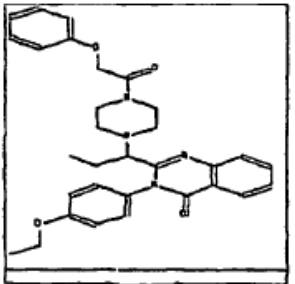
% medio de inhibición/aumento de células BJELR

% medio de inhibición/aumento de células BJEH



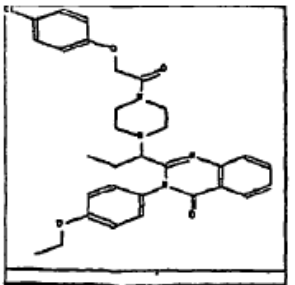
-41%

5%



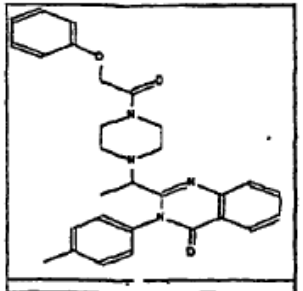
-35%

-4%



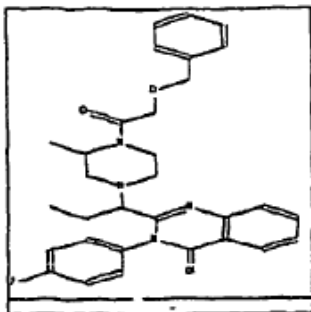
-29%

5%



-21%

-2%



-16%

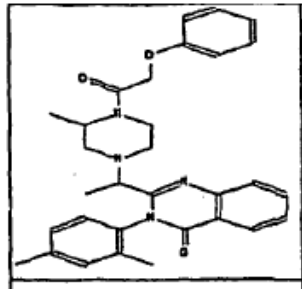
-4%

ES 2 409 686 T3

Molécula

% medio de inhibición/aumento de células BJELR

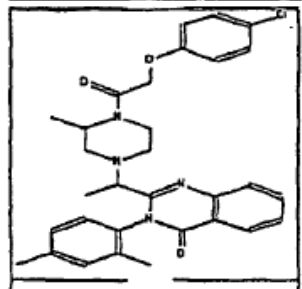
% medio de inhibición/aumento de células BJEH



\*

-29%

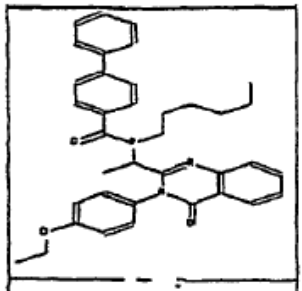
-13%



\*

-25%

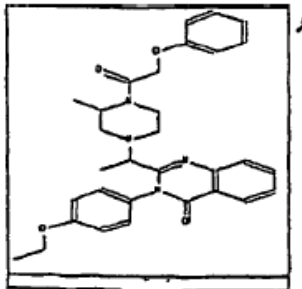
-10%



\*

-30%

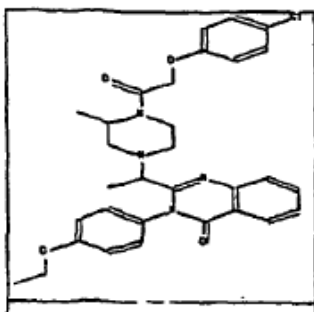
-8%



\*

-9%

-26%



\*

-16%

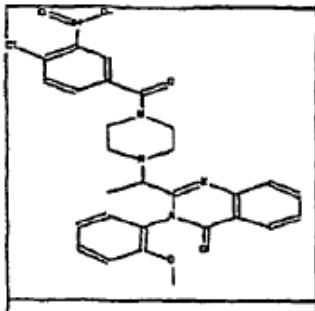
-11%

ES 2 409 686 T3

Molécula

% medio de inhibición/aumento de células BJELR

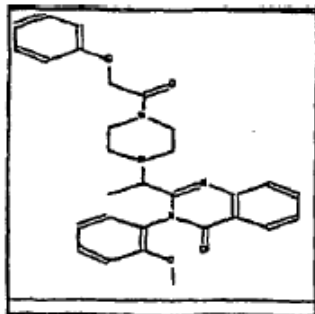
% medio de inhibición/aumento de células BJEH



\*

-26%

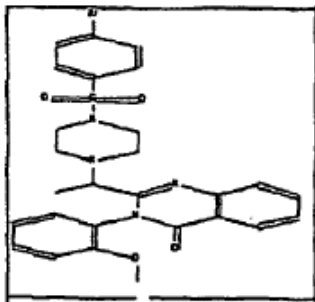
5%



\*

-23%

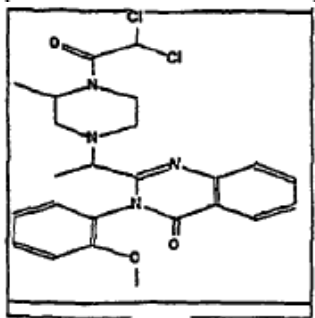
-4%



\*

-26%

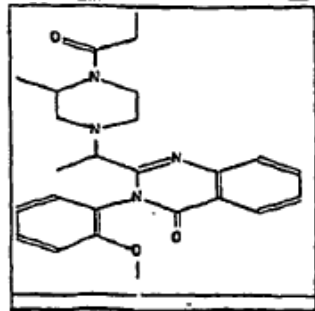
2%



\*

-8%

-7%



\*

25%

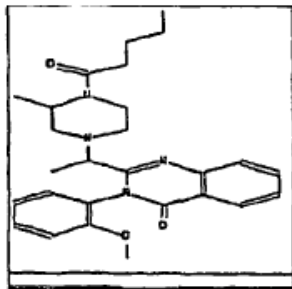
44%

ES 2 409 686 T3

Molécula

% medio de inhibición/aumento de células BJELR

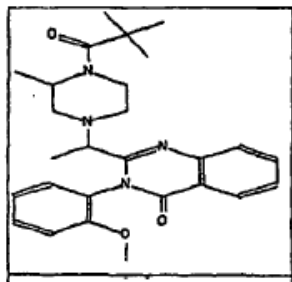
% medio de inhibición/aumento de células BJEH



\*

-32%

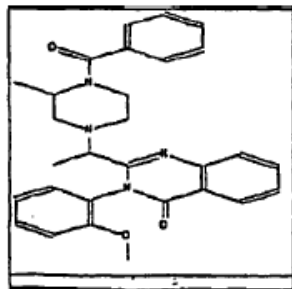
3%



\*

-30%

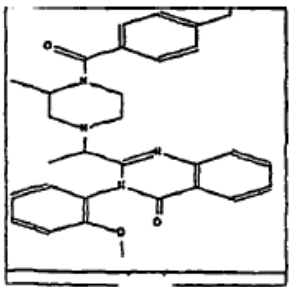
-5%



\*

-24%

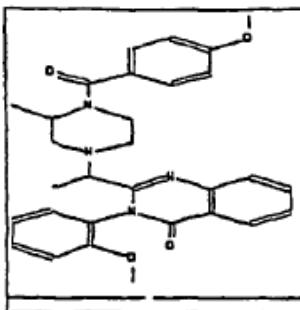
1%



\*

-29%

-3%



\*

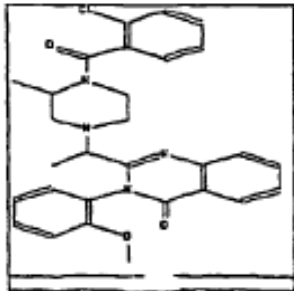
-37%

0%

Molécula

% medio de inhibición/aumento de células BJELR

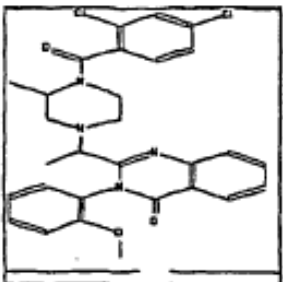
% medio de inhibición/aumento de células BJEH



\*

-35%

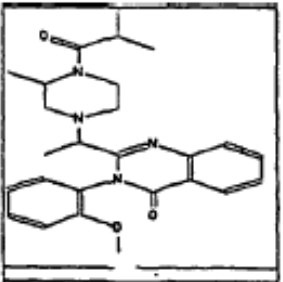
-7%



\*

-32%

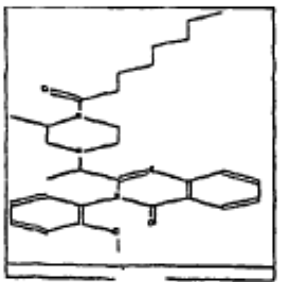
0%



\*

-33%

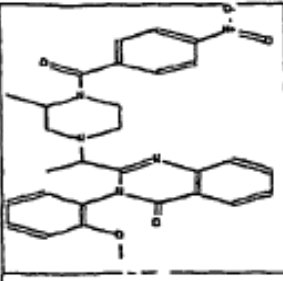
0%



\*

-41%

-14%



\*

-20%

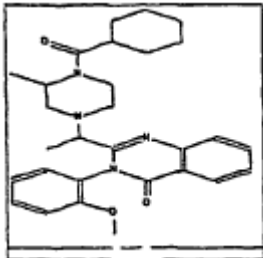
6%

ES 2 409 686 T3

Molécula

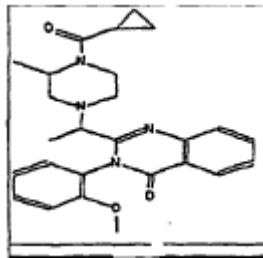
% medio de inhibición/aumento de células BJELR

% medio de inhibición/aumento de células BJEH



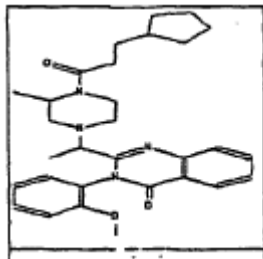
-30%

-4%



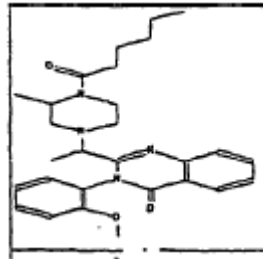
12%

41%



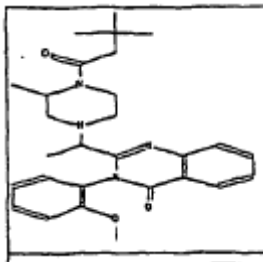
-22%

9%



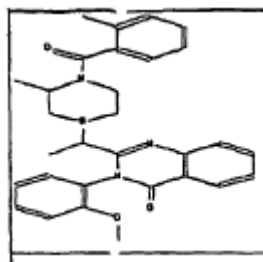
-31%

11%



-20%

4%



-19%

0%

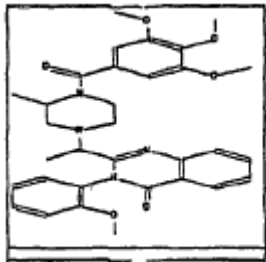


ES 2 409 686 T3

Molécula

% medio de inhibición/aumento de células BJELR

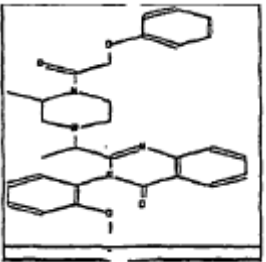
% medio de inhibición/aumento de células BJEH



\*

-26%

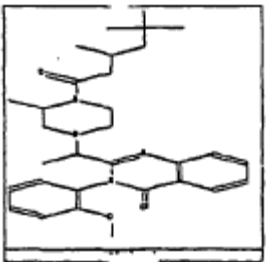
7%



\*

-41%

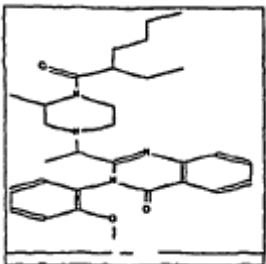
-2%



\*

-25%

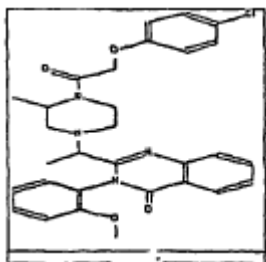
-5%



\*

-43%

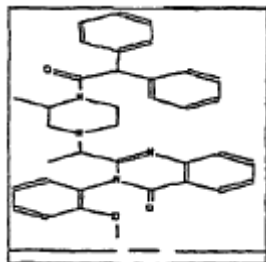
0%



\*

-20%

4%



\*

-28%

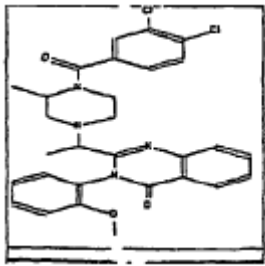
8%

ES 2 409 686 T3

Molécula

% medio de inhibición/aumento de células BJELR

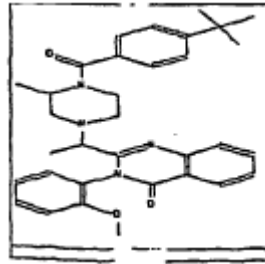
% medio de inhibición/aumento de células BJEH



\*

-49%

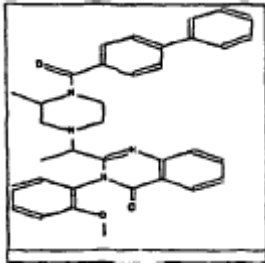
-15%



\*

-26%

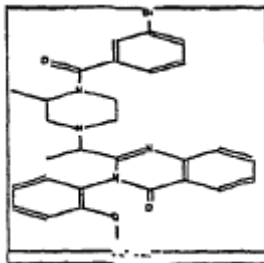
0%



\*

-36%

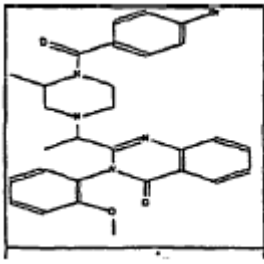
-10%



\*

6%

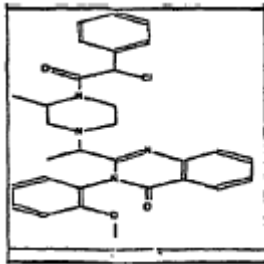
9%



\*

-26%

-6%

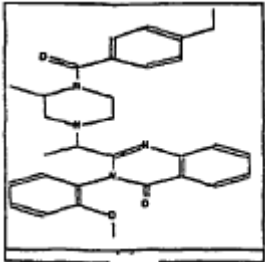
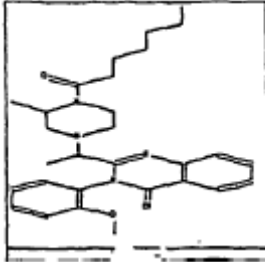
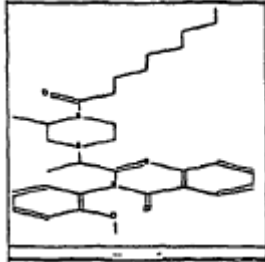
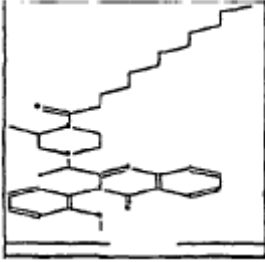
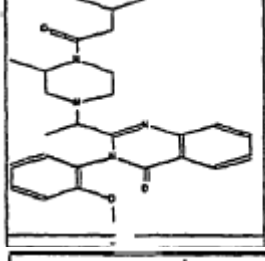
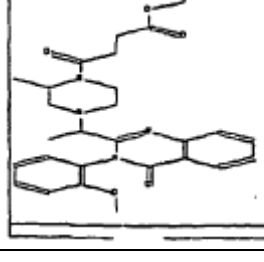


\*

-38%

-4%

ES 2 409 686 T3

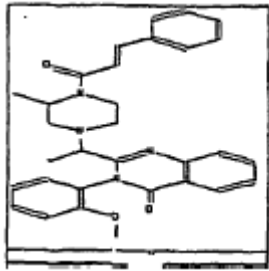
Molécula	% medio de inhibición/aumento de células BJELR	% medio de inhibición/aumento de células BJEH
	-31%	-6%
	-36%	-9%
	-37%	-9%
	-30%	11%
	-33%	3%
	-43%	-17%

ES 2 409 686 T3

Molécula

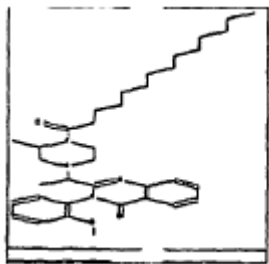
% medio de inhibición/aumento de células BJELR

% medio de inhibición/aumento de células BJEH



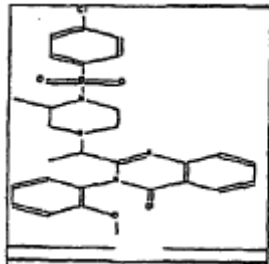
-26%

5%



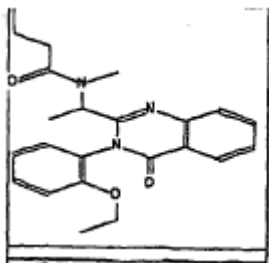
-31%

15%



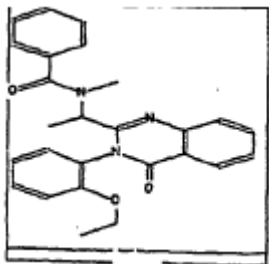
-10%

-5%



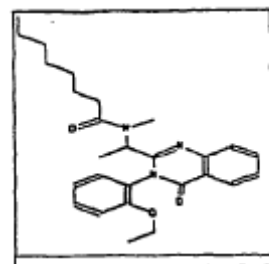
-34%

3%



-48%

4%



-27%

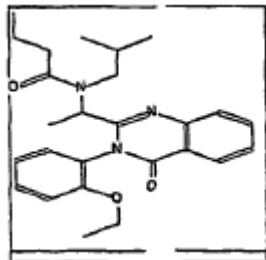
-1%

ES 2 409 686 T3

Molécula

% medio de inhibición/aumento de células BJELR

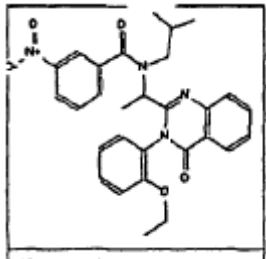
% medio de inhibición/aumento de células BJEH



\*

-33%

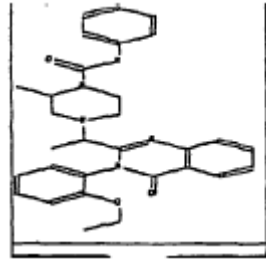
-10%



\*

-23%

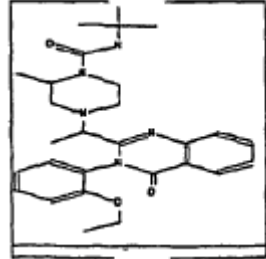
-5%



\*

-24%

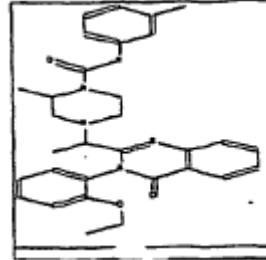
-2%



\*

-20%

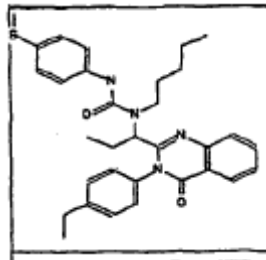
-9%



\*

-34%

-3%



\*

-25%

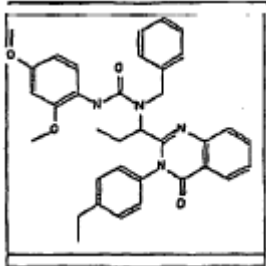
-9%

ES 2 409 686 T3

Molécula

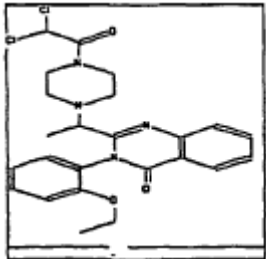
% medio de inhibición/aumento de células BJELR

% medio de inhibición/aumento de células BJEH



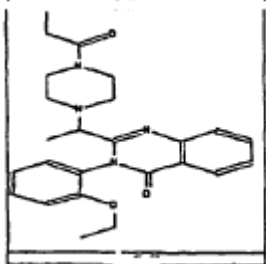
-28%

-4%



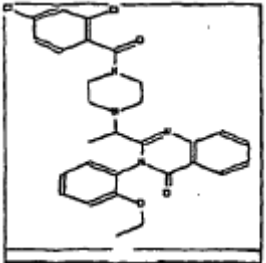
-39%

10%



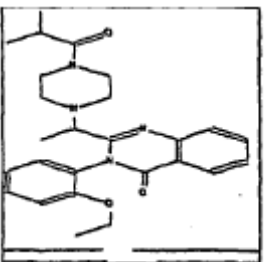
-40%

-4%



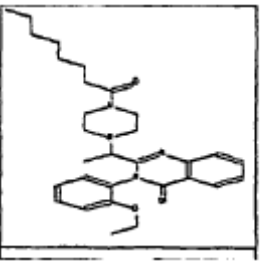
-43%

0%



42%

54%



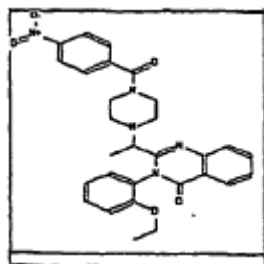
-24%

6%

Molécula

% medio de inhibición/aumento de células BJELR

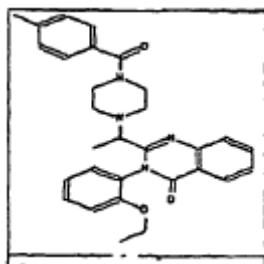
% medio de inhibición/aumento de células BJEH



\*

-46%

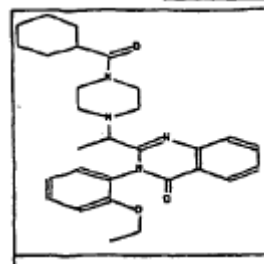
2%



\*

-28%

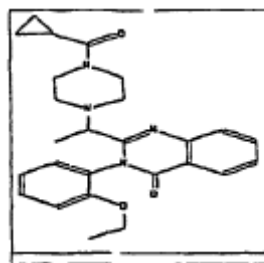
-2%



\*

-38%

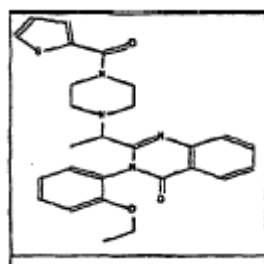
6%



\*

46%

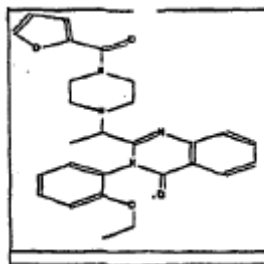
64%



\*

-44%

-7%



\*

-40%

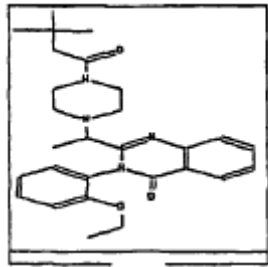
-3%

ES 2 409 686 T3

Molécula

% medio de inhibición/aumento de células BJELR

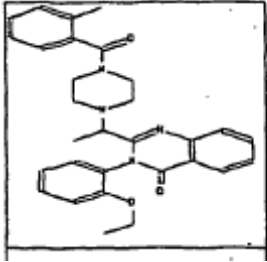
% medio de inhibición/aumento de células BJEH



\*

-44%

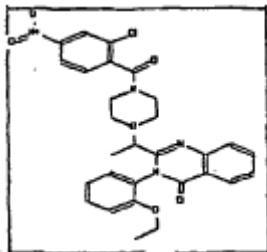
-3%



\*

-40%

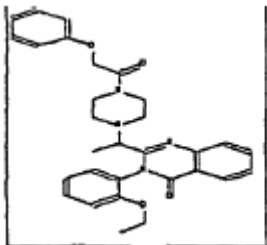
0%



\*

-49%

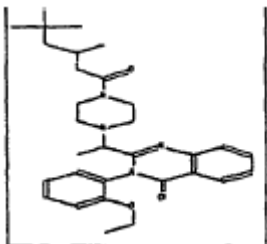
-6%



\*

-13%

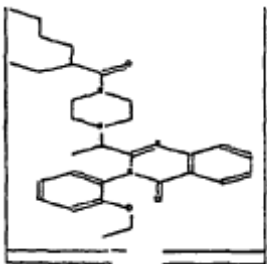
-5%



\*

-40%

-2%



\*

-39%

3%

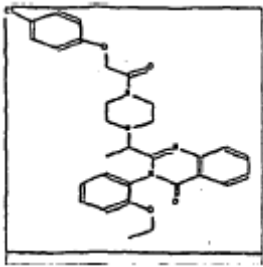


ES 2 409 686 T3

Molécula

% medio de inhibición/aumento de células BJELR

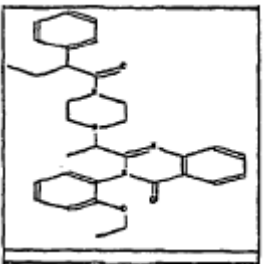
% medio de inhibición/aumento de células BJEH



\*

100%

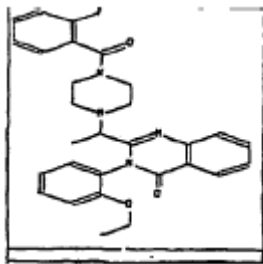
10%



\*

-48%

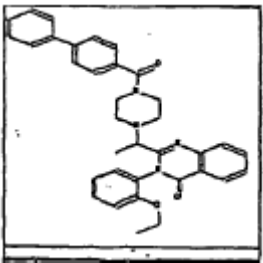
-2%



\*

-31%

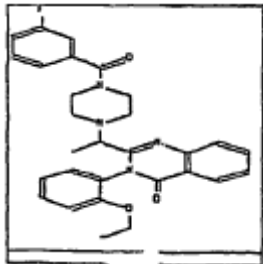
9%



\*

-25%

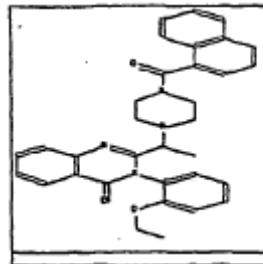
5%



\*

-38%

-11%



\*

-41%

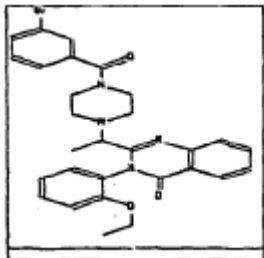
4%

ES 2 409 686 T3

Molécula

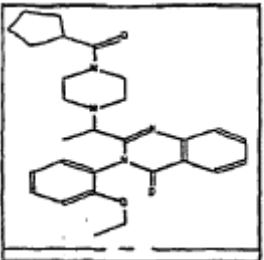
% medio de inhibición/aumento de células BJELR

% medio de inhibición/aumento de células BJEH



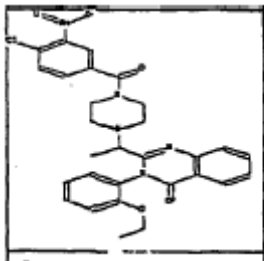
-49%

3%



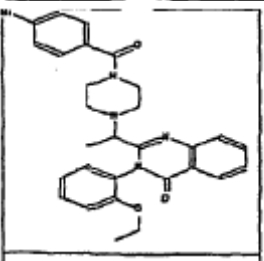
-42%

1%



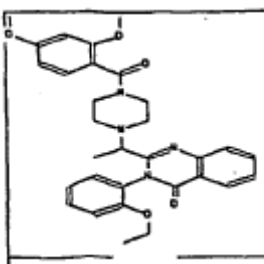
-57%

-11%



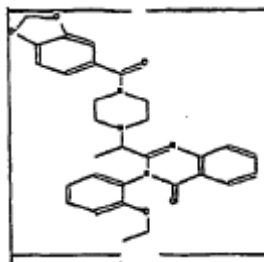
-31%

3%



-42%

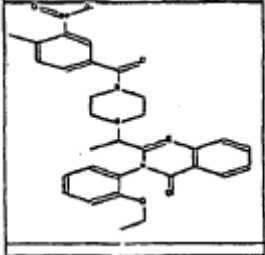
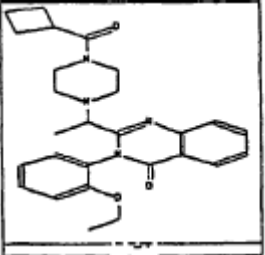
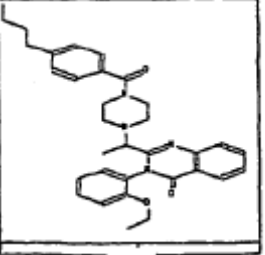
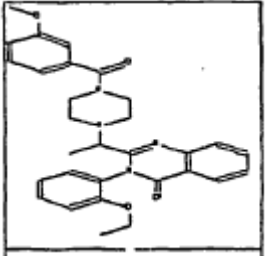
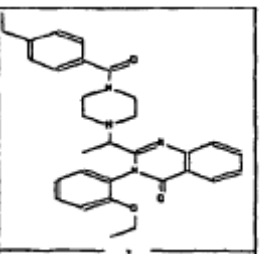
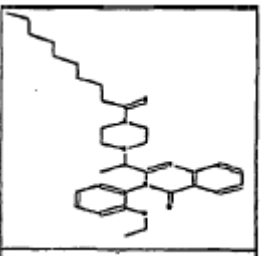
-3%



-42%

-4%

ES 2 409 686 T3

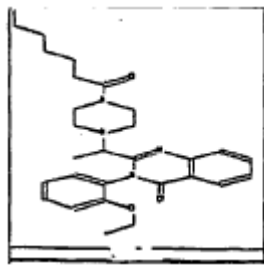
Molécula	% medio de inhibición/aumento de células BJELR	% medio de inhibición/aumento de células BJEH
	-38%	-11%
	-4%	27%
	-33%	8%
	-26%	-4%
	-41%	-5%
	-35%	-2%

ES 2 409 686 T3

Molécula

% medio de inhibición/aumento de células BJELR

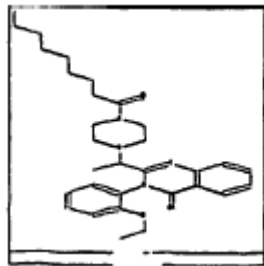
% medio de inhibición/aumento de células BJEH



\*

-30%

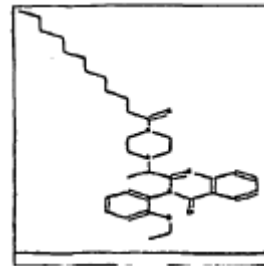
12%



\*

-28%

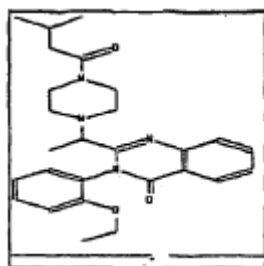
2%



\*

-46%

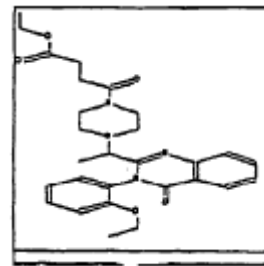
-14%



\*

-33%

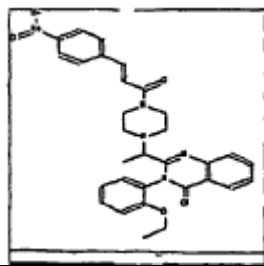
6%



\*

-40%

-4%



\*

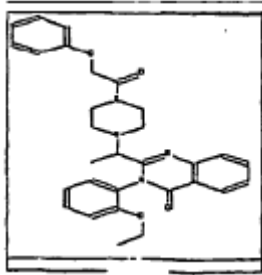
-17%

2%

Molécula

% medio de inhibición/aumento de células BJELR

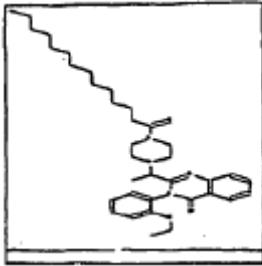
% medio de inhibición/aumento de células BJEH



\*

-32%

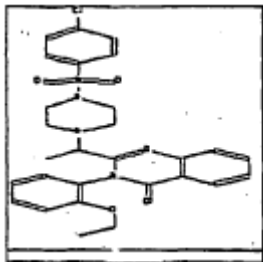
-6%



\*

-38%

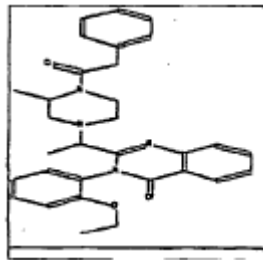
-1%



\*

-45%

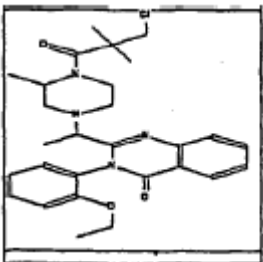
0%



\*

-26%

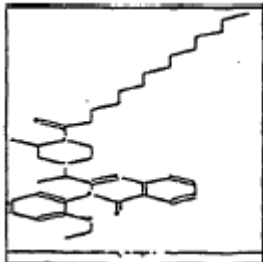
6%



\*

-28%

2%



\*

-37%

-5%

\*No de acuerdo con la invención

**EJEMPLO 4. Identificación y caracterización de las parejas de unión de la erastina**

Se usaron ensayos de interacción con erastina inmovilizada y lisados celulares en un intento inicial por identificar parejas de unión de la erastina dentro de una célula. Los experimentos de interacción iniciales se realizaron con lisados de células enteras HEK293, BJEH y BJELR. En esos experimentos, se inmovilizó un derivado de metilamino de erastina (ERA-A6) en Affigel 10 y se incubaron con lisado en condiciones estándar de interacción. Se lavaron las perlas y se eluyeron bien con erastina 100  $\mu$ M o con *N*-laurilsarcosina al 0,8% (sarcosil). Se sometieron los eluatos a un análisis de espectrometría de masas.

El análisis de los resultados del ensayo de interacción de la erastina mostraron una alta tasa de proteínas mitocondriales o de membrana del RE identificada en este primer conjunto de experimentos de interacción con lisados HEK293 o BJEH y BJELR. Esto sugiere que los poros de la membrana pueden ser una diana de la erastina o de sus análogos. Sin embargo, este resultado no excluye la posibilidad de que la erastina podría tener otras dianas adicionales y/o diferentes que todavía no se han identificado en este conjunto de experimentos de interacción.

Varias proteínas se observaron repetidas veces en los experimentos de interacción con erastina o análogos de erastina. Estas proteínas, incluyendo VDAC1, VDAC2, VDAC3, Prohibitina, Riboforina, Sec61a y Sec22b, presumiblemente, son dianas de la erastina.

Puesto que las mezclas de lisados de células enteras seguían siendo bastante complejos, esas proteínas solo se detectaron en las eluciones de sarcosilo de los experimentos de interacción. Esto posiblemente complica el análisis de espectrometría de masas. Por lo tanto, para simplificar la mezcla, se usaron diversos métodos de separación para aislar o preconcentrar algunas de las proteínas identificadas a partir de los experimentos de interacción con lisados de células enteras.

Como la prohibitina y las isoformas de VDAC son todas proteínas mitocondriales, los solicitantes enriquecieron las posibles dianas de la erastina mediante el aislamiento de las mitocondrias de los lisados celulares. Luego se usaron los extractos mitocondriales aislados en los experimentos de interacción de la erastina. En esos experimentos de interacción de la erastina con los extractos mitocondriales, también se identificaron la prohibitina, VDAC y la riboforina mediante transferencia Western. La Figura 14 muestra transferencias Western de una interacción en la que se puso en contacto un extracto mitocondrial con derivados de erastina activos (A6) e inactivos (B1) inmovilizados sobre perlas. Los ensayos de interacción se realizaron con 0,25 mg de proteína total del extracto mitocondrial. Se incubaron las perlas con los extractos durante 1,5 horas a 4 °C y luego se lavaron varias veces. Se eluyeron las proteínas unidas a los derivados de erastina inmovilizados con 50  $\mu$ l de solución de *N*-laurilsarcosina al 0,8%. Se identificaron las proteínas mediante transferencia Western con una mezcla de anticuerpos contra la riboforina, contra Sec6, contra la prohibitina y contra VDAC. Las proteínas también se identificaron mediante análisis de EM.

La riboforina y la prohibitina son proteínas bastante ácidas con un IP calculado de 5,57 (Prohibitina) y 5,96 (riboforina I). Los solicitantes separaron esas dos proteínas de las proteínas más básicas (isoformas de VDAC, Sec22 y Sec61a) mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna MonoQ a un pH de 6,8. También se analizó el contenido de prohibitina o de riboforina de las fracciones usando anticuerpos. También se analizó la unión de las fracciones a una superficie BIACORE™ que contenía compuestos ERA-A6 y ERA-B1 inmovilizados. Se encontraron prohibitina y riboforina en las fracciones que mostraron unión en los experimentos BIACORE™. Curiosamente, se observó la unión de una proteína desconocida de 45 kDa que no reaccionó con ninguno de los anticuerpos usados a las perlas de ERA-A6 o ERA-B1 en un gel de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido de plata

Para confirmar esos hallazgos, se realizaron experimentos de interacción con ERA-A6 y ERA-B1 a partir de las fracciones de las eluciones de MonoQ. Una vez más, se identificaron la prohibitina y la riboforina como parejas de unión de las perlas de erastina de varias fracciones. Estos experimentos apoyan claramente la idea de que las isoformas de VDAC, así como la prohibitina y la riboforina se unen a la erastina y los análogos de erastina. Así pues, todas estas proteínas son las posibles dianas/parejas de unión de la erastina *in vivo*.

**EJEMPLO 5. Niveles de expresión de diversas isoformas de VDAC**

Los ensayos de interacción realizados satisfactoriamente con el análogo de erastina ERA-A6 produjeron sistemáticamente mayores puntuaciones de identificación basada en EM para VDAC3 al realizar los ensayos de interacción a partir del lisado de BJELR, en comparación con el lisado derivado de las células BJEH. Las puntuaciones más altas para esa isoforma de VDAC coinciden con una mayor abundancia de esa isoforma en el lisado de BJELR en relación con el lisado de BJEH, dada una cantidad comparable de proteína total. Estos diferentes niveles de proteína diana podrían tener un impacto sobre la selectividad de la erastina.

Para abordar este punto, los solicitantes analizaron los niveles de expresión relativos de las diversas isoformas de VDAC mediante PCR cuantitativa (Q-PCR). Otros posibles métodos incluyen transferencia Western y espectrometría de masas.

Se realizaron experimentos de PCR cuantitativa (Q-PCR) para determinar las cantidades relativas de ARNm (como un marcador sustituto para la expresión génica) para una variedad de genes en la línea celular BJEH "normal" y la línea BJELR tumorigénica. Para cada una de las isoformas de VDAC (VDAC1, 2 y 3), dos regiones del ARNm fueron objeto de amplificación. Estas regiones se denominaron 1 y 1-2, 2-1 y 2-2 y 3-1 y 3-2, respectivamente. Se comparó la señal de Q-PCR para la amplificación del fragmento de ARNm para cada gen de interés con una serie de patrones internos y se escaló con respecto a la señal obtenida del ARNm de GAPDH en las células diana. Los resultados representados en la Figura 11 indican que la expresión de VDAC3 es significativamente elevada en las células BJELR con respecto a la de las células BJEH. Este hallazgo se contradice con los resultados observados para otros genes, que se suprimieron en las células BJELR con respecto a los observados en las células BJEH.

La Figura 12 se generó usando los mismos datos de Q-PCR que en la Figura 11, pero la Figura 12 se centra exclusivamente en los niveles de expresión relativos de las isoformas de VDAC en las células diana. Se comparó la señal de la Q-PCR para cada fragmento de ARNm amplificado con una serie de patrones internos, y se expresó con respecto a la señal obtenida de ARNm de VDAC1 en las células diana, que se define como el 100%. Como en la Figura 11, las dos regiones amplificadas del ARNm para cada una de las isoformas de VDAC (VDAC1, 2 y 3), se conocen como 1, 1-2, 2-1, 2-2, 3-1 y 3-2, respectivamente. Los resultados indican que la expresión de VDAC3 se expresa a un nivel de 2 a 2,5 veces superior en las células BJELR que en las células BJEH.

En conjunto, estos hallazgos sugieren un posible mecanismo para explicar la diferente sensibilidad de las células BJELR hacia el tratamiento con erastina.

#### **EJEMPLO 6. Evaluación funcional de la erastina en diversas isoformas de VDAC**

Los ensayos funcionales ayudan a validar las proteínas identificadas como dianas funcionales para la erastina. En ciertas realizaciones, las mitocondrias aisladas se podrían usar para ver si la erastina tiene algún efecto funcional o fenotípico en la función de las mitocondrias. Por ejemplo, se podrían observar los efectos fenotípicos a través del microscopio, mientras que la detección de cambios en el potencial de la membrana mitocondrial o la liberación de especies oxidantes tras el tratamiento con erastina se podría observar mediante el uso de ciertos colorantes, conocidos en la técnica para la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS).

En ciertas otras realizaciones, los experimentos de validación podrían incluir el marcaje mediante fotoafinidad de la proteína diana con derivados de azido-erastina, o análogos o derivados de erastina acoplados a un agente de reticulación marcado por afinidad bidentado (tal como SBED) o un agente de reticulación escindible.

En otras realizaciones más, las proteínas recombinantes y sobre-expresadas se podrían usar en ciertos ensayos *in vitro* para evaluar cualquier posible efecto que la erastina pudiera tener sobre sus funciones. Tales ensayos *in vitro* podrían incluir, pero sin limitación: unión directa (*in vitro* o BIACORE™) o ensayos de eflujo que podrían determinar las propiedades del canal de las isoformas de VDAC.

En otras realizaciones más, se pueden usar los mutantes desactivados (células u organismos) de esas proteínas diana. En comparación con los de tipo natural, estos mutantes podrían convertirse bien en resistentes o en hipersensibles a la erastina. Esas líneas de células desactivadas también se podrían usar en rastreos de alto rendimiento (HTS) para determinar y/o evaluar la especificidad de la erastina o de sus análogos.

En otras realizaciones más, los experimentos de ARNi para las proteínas VDAC, prohibitina y riboforina también se pueden usar para evaluar cualquier fenotipo tras el tratamiento con erastina (por ejemplo, resistencia o hipersensibilidad a la erastina). De acuerdo con esta realización de la invención, se pueden adquirir siARN SMARTPOOL® dirigidos a VDAC1, VDAC2 y VDAC3, respectivamente, en Dharmacon (Lafayette, CO). Después se pueden optimizar las condiciones de transfección, por ejemplo, usando FUGENE™ y oligofectamine en placas de 384 pocillos y un dúplex de siARN marcado con fluorescencia. Tal procedimiento tuvo una eficiencia de transfección del ~90%. Luego se pueden transfectar las células tumorales ELR con los siARN contra VDAC1, VDAC2 o VDAC3, y se puede medir la dosis-respuesta hacia la erastina.

#### **EJEMPLO 7. Inhibición del crecimiento celular**

Se mide la capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento de células BJELR y BJEH. Los compuestos se analizan mediante el rastreo primario Sytox, un ensayo fenotípico que hace un seguimiento de las alteraciones producidas en la supervivencia-proliferación celular como resultado del tratamiento con compuestos. Se ideó como método de alto rendimiento para identificar compuestos que alteran específicamente el potencial de crecimiento de las células que albergan las mutaciones causales encontradas en los pacientes con cáncer, pero no afectan al crecimiento de las células normales. El ensayo se basa en una lectura de bajo coste, simple y fiable de un colorante fluorescente impermeable a través de la membrana (Sytox, de Molecular Probes), que se une al ácido nucleico. En las células sanas, no se detecta señal porque la membrana celular está intacta y el colorante no entra. Sin embargo, si una membrana celular se ve comprometida como resultado de la apoptosis o la necrosis, se detectará una señal fluorescente proporcional al número de células similarmente afectadas. Mediante la utilización de una lectura de dos etapas (lectura final en presencia de detergente para permitir el marcaje de todas las células), el ensayo puede

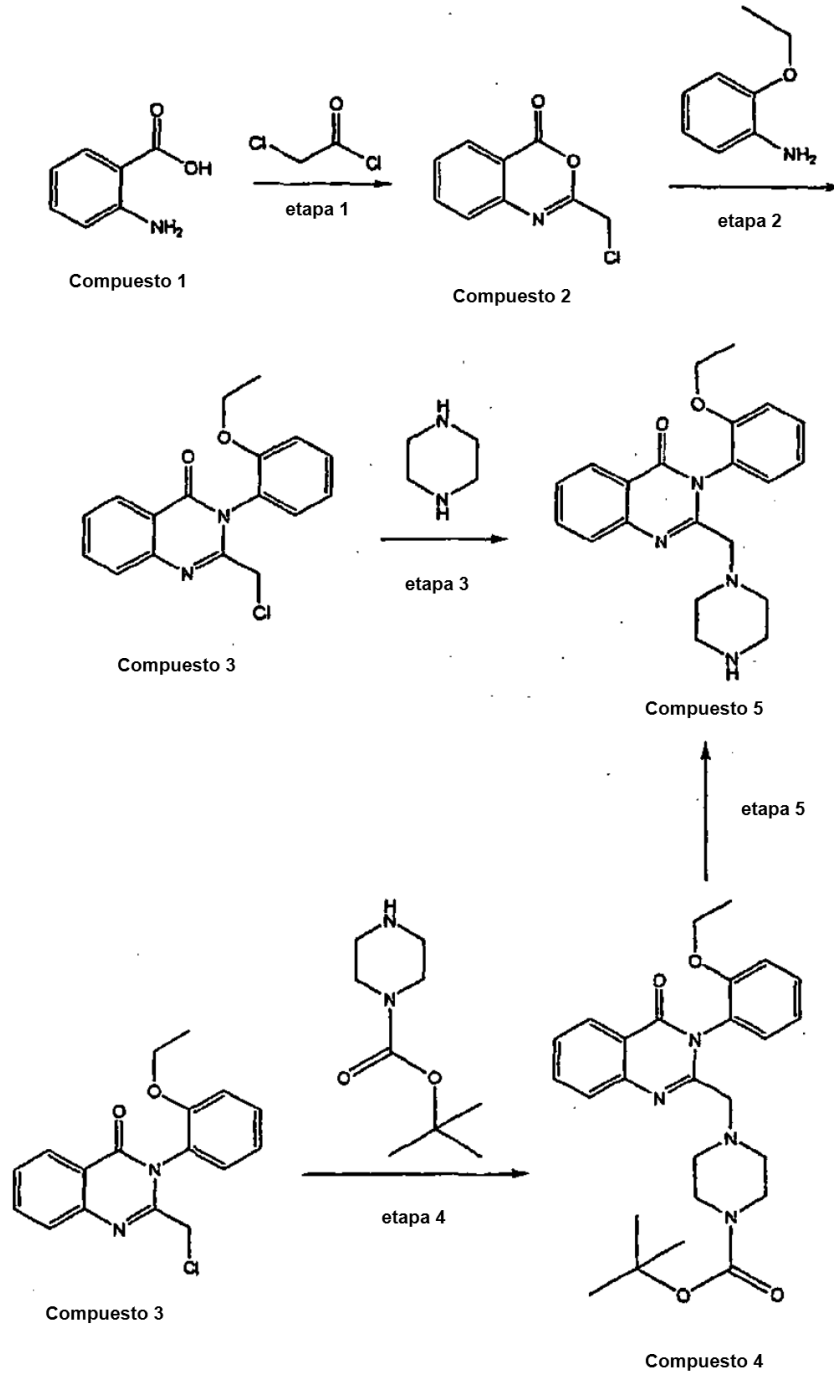
identificar compuestos que produzcan citostasis, citotoxicidad y/o mitogénesis. La primera lectura o lectura de "células muertas" proporciona una estimación de la toxicidad de un compuesto dado, indicando el número de células muertas o moribundas del cultivo en el momento del ensayo. La segunda lectura o lectura de "células totales" capta tanto los efectos acumulados de la citotoxicidad en la reducción del tamaño de la población de células, como los efectos citostáticos o antiproliferativos que un compuesto de ensayo puede ejercer sobre las células de la población de ensayo en ausencia de toxicidad.

A los efectos del rastreo, la línea BJ-TERT anteriormente descrita se define como línea celular de referencia "normal" y las células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> son la línea celular tumorigénica. Las células se sembraron durante una noche en placas de 96 pocillos a densidades que sin tratamiento permitirían una confluencia del 95% en los pocillos 72 horas más tarde. Al día siguiente, se exponen las células a los compuestos de ensayo en una serie de diluciones durante un período de 48 horas. Después de este período de incubación, se añade el reactivo Sytox a los cultivos a la concentración recomendada por el fabricante y se toma la lectura de la fluorescencia de las células muertas. Una vez finalizada esta medición, se añade el detergente saponina a cada pocillo de los cultivos para permeabilizar las membranas permitiendo que el reactivo Sytox entre en cada célula, facilitando de ese modo la medición del número total de células que quedan en el cultivo.

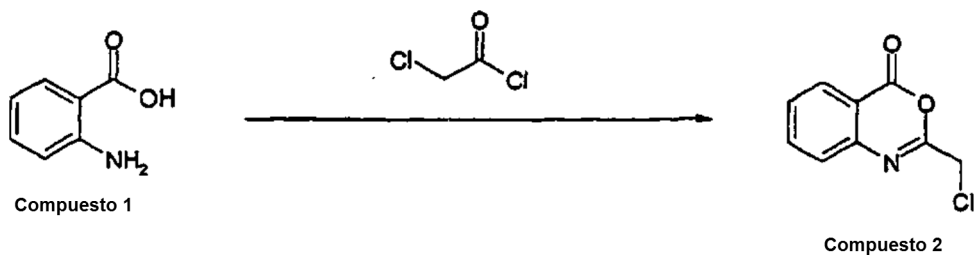
sigue ejemplo 8 en página siguiente



EJEMPLO 8. Síntesis de 3-(2-etoxifenil)-2-(piperazin-1-ilmetil)quinazolin-4(3H)-ona (Compuesto 5)



5 Etapa 1: Preparación de 2-(clorometil)-4H-benzo[d][1,3]oxazin-4-ona (Compuesto 2)

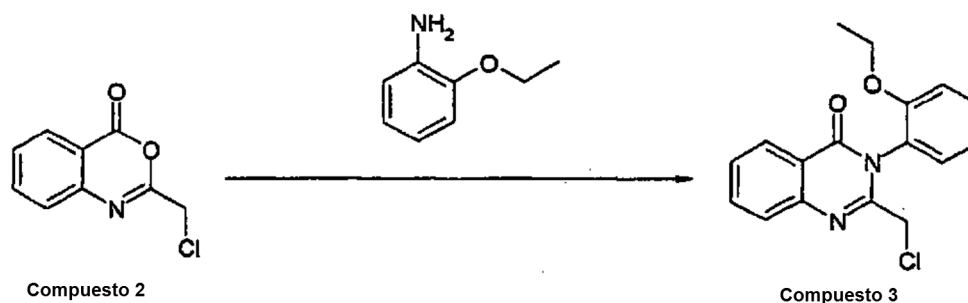


## Método 1:

En una atmósfera de nitrógeno, se disolvió ácido antranílico (compuesto 1, 15,3 g) en 300 ml de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). A continuación, se añadió trietilamina (TEA, 1,1 equiv) y se enfrió la mezcla en un baño de agua helada.  
 5 Se añadió una solución de cloruro de cloroacetilo (1,1 equiv) en diclorometano (150 ml) gota a gota y se dejó agitar la mezcla durante dos horas con calentamiento a temperatura ambiente. (El baño de hielo se puede eliminar al final de la adición o se puede dejar calentar la mezcla hasta la temperatura ambiente durante dos horas). Los sólidos se aislaron mediante filtración y se lavaron con agua fría (x 2) seguida de éter dietílico al 5% ( $\text{Et}_2\text{O}$ ) en hexano, y se secó al aire, dando el compuesto 2 como un sólido en polvo blanco (22,5 g, rendimiento cuantitativo). El producto  
 10 final se caracterizó mediante EM-CL  $m/z$   $\text{MH}^+$  196,13; >95% de pureza; RMN de  $^1\text{H}$ .

## Método 2: Uso de dimetilformamida (DMF) como disolvente de reacción

Se disolvieron 10 gramos de ácido antranílico en 300 ml de DMF. Se añadió TEA (1,5 equiv) y se enfrió la mezcla en un baño de agua con hielo. Se añadió una solución de cloruro de cloroacetilo (1,3 equiv) en DMF (100 ml) gota a gota a la mezcla de reacción enfriada. Se retiró el baño de agua con hielo, y se dejó la mezcla de reacción en agitación durante 2 horas. Se vertió la mezcla de reacción en agua enfriada con hielo (200-300 ml) y se extrajo con acetato de etilo (EtOAc, 3 veces). Se combinaron las capas orgánicas, se lavaron con agua y salmuera, y se secaron sobre sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). La concentración proporcionó un sólido que se trituró con 100 ml de  $\text{Et}_2\text{O}$   
 15 al 10%/hexano, obteniéndose el compuesto 2 en forma de un polvo blanco (12 g, rendimiento del 85%). El producto final se caracterizó mediante EM-CL.

Etapa 2: Preparación de 2-(clorometil)-3-(2-etoxifenil)quinazolin-4(3H)-ona (Compuesto 3)

25

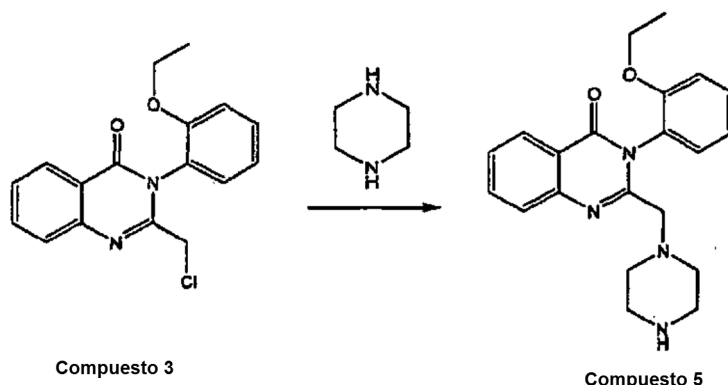
Método 1- usando triclorofosfina ( $\text{PCl}_3$ ):

En una atmósfera de nitrógeno, se disolvió el compuesto 2 (8,8 g) en 440 ml de acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) y, a esto, se añadió 2-etoxibencenoamina (1,5 equiv) y se agitó. A esta mezcla de reacción bien agitada, se añadió  $\text{PCl}_3$  (2 equivalentes) gota a gota. Se calentó la suspensión resultante hasta 50 °C durante 6-12 horas. Se vertió la mezcla de reacción en mezcla de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ /hielo saturada, se agitó durante 30 min y se extrajo con EtOAc (3 x 300 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con (una cantidad mínima de) agua y salmuera, y se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se concentró la solución, y se trituró la mezcla del sólido en bruto/aceite con  $\text{Et}_2\text{O}$  al 3%/hexano (2 x  
 35 100 ml) para eliminar la mayor parte de la fenetidina sin reaccionar. Se aislaron los sólidos resultantes mediante filtración y se purificaron adicionalmente haciéndolos pasar a través de una columna de gel de sílice (EtOAc al 20%/hexano). El Compuesto 3 se aisló en forma de un polvo blanco (11 g, 75-80%). El producto final se caracterizó mediante EM-CL  $m/z$   $\text{MH}^+$  315/317; pureza de > 98%.

Método 2- usando tricloruro de fosforilo ( $\text{POCl}_3$ ):

En una atmósfera de nitrógeno, se disolvieron el compuesto 2 (1,2 g; 6,0 mmol; 1,0 equiv) y 2-etoxibencenoamina (1,2 ml; 9,0 mmol, 1,5 equiv) en 30 ml de  $\text{CH}_3\text{CN}$ . A esta solución, se añadió  $\text{POCl}_3$  (1,1 ml, 12 mmol, 2,0 equiv.) gota a gota, y se calentó la mezcla a reflujo durante un periodo de 3 horas. Se enfrió la reacción hasta la temperatura ambiente, se vertió en una suspensión de hielo/ $\text{NaHCO}_3$  saturado, y se extrajo con EtOAc (3 x 200 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con agua y salmuera y se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . El análisis de la mezcla de reacción en bruto mediante EM-CL confirmó la presencia del compuesto producto deseado 3 (97%) junto con una pequeña cantidad de un compuesto subproducto 3c (2-3%). El  $\text{MH}^+$   $m/z$  (333/334/335) de la EM-CL coincide con la estructura de diamida del compuesto 3c. El producto deseado se aisló típicamente tras la cromatografía sobre gel de sílice (como se describe anteriormente en el Método 1 de la Etapa 2), dando el  
 45 compuesto 3 en forma de un polvo blanco (1,3 g, rendimiento del 80-85%).

50

Etapa 3: Preparación de 3-(2-etoxifenil)-2-(piperazin-1-ilmetil)quinazolin-4(3H)-ona (Compuesto 5)

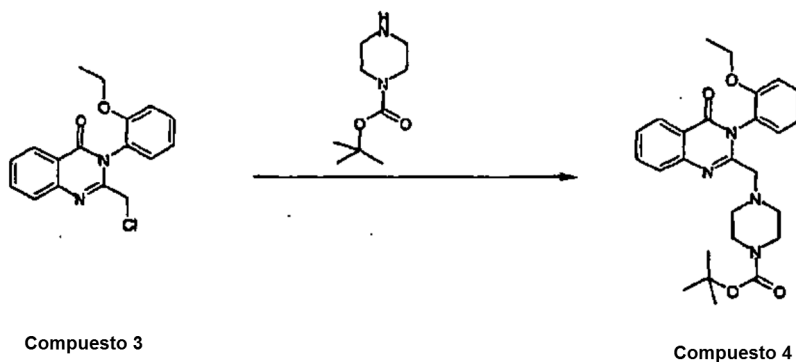
Método 1:

5

En una atmósfera de nitrógeno, se disolvió el **Compuesto 3** (5 g) en CH<sub>3</sub>CN (0,08 - 0,2 M de concentración del compuesto) y, a esto, se añadió carbonato de potasio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,2 equiv, polvo comercial), piperazina (2 equiv.) y yoduro de tetrabutilamonio (0,2 equiv) en ese orden. Se calentó la mezcla hasta 60 °C (temperatura del baño) durante 8-10 horas. Se trató la reacción en cualquiera de las dos formas siguientes: (a) se evaporó el 80% del disolvente, se añadió agua (20 ml) y se extrajo la mezcla con EtOAc (4 x 60 ml); o (b) se diluyó la mezcla de reacción con 400 ml de EtOAc y se lavó con agua (3 x 20 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera y se concentraron, proporcionando un aceite de color ligeramente amarillo. El Compuesto 5 se obtuvo en forma de un polvo blanco (80-85% de rendimiento) tras la purificación mediante cromatografía de media presión (CombiFlash®) en sílice (10-25% de MeOH/diclorometano). El producto se caracterizó mediante RMN de <sup>1</sup>H y EM-CL MH<sup>+</sup> 365.

10

15

Etapa 4: Preparación de 4-((3-(2-etoxifenil)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-2-il)metil)piperazin-1-carboxilato de *tert*-butilo (Compuesto 4)

20

Método 1:

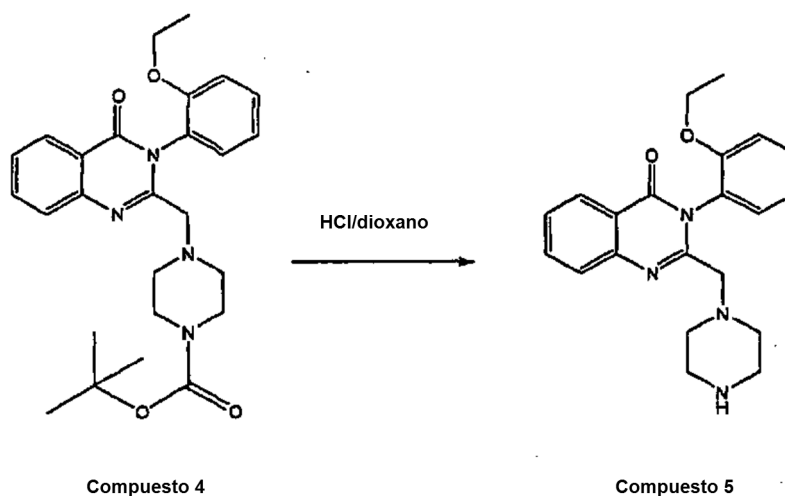
25

En una atmósfera de nitrógeno, se disolvió el **Compuesto 3** (4,0 g, 12,7 mmol, 1,0 equiv.) en 60 ml de CH<sub>3</sub>CN y, a esta solución, se añadieron muestras sólidas de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,1 g, 15 mmol, 1,2 equiv.), Boc-piperazina (4,73 g, 25 mmol, 2,0 equiv.) y yoduro de sodio (NaI, 570 mg, 3 mmol, 0,3 equiv.) en ese orden. La mezcla (una suspensión) se calentó hasta 80 °C durante 3-6 h. Se produjo una suspensión blanca. El examen de la reacción mediante CCF y EM-CL mostró la conversión completa del **Compuesto 3** en el **Compuesto 4**. Se eliminaron aproximadamente 30 ml de CH<sub>3</sub>CN mediante destilación a presión reducida y, a la suspensión resultante, se añadieron 60 ml de agua, y se extrajo la mezcla con EtOAc (4 x 60 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con agua, una solución saturada de cloruro de amonio (para eliminar la Boc-piperazina sin reaccionar), una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera, y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La concentración de la filtración proporcionó sólidos que se trituraron con hexano, proporcionando el **Compuesto 4** en forma de un sólido blanco (5,6 g, rendimiento cuantitativo). Este material se usó en la posterior etapa de desprotección sin purificación adicional. El compuesto final se caracterizó mediante RMN de <sup>1</sup>H, EM-CL.

30

35

## Etapa 5. Preparación de 3-(2-etoxifenil)-2-(piperazin-1-ilmetil)quinazolin-4(3H)-ona (Compuesto 5)



## Método 1:

5 Se suspendió el **Compuesto 4** (2,7 g, 5,8 mmol, 1,0 equiv.) en 15 ml de dioxano anhidro a temperatura ambiente. Se añadió una solución de HCl 4 N/dioxano (17 ml, 12 equiv) gota a gota a temperatura ambiente; después de 30 min de reacción, se añadieron 17 ml más de HCl 4 N/dioxano y se hizo un seguimiento del progreso de la reacción mediante EM-CL. (Se produjo una reacción exotérmica y se observó la evolución de gas. El sistema de reacción debe estar abierto para evacuar la presión manteniendo al mismo tiempo condiciones anhidras). Si permanece cualquier cantidad de Compuesto 4 sin reaccionar, se pueden añadir otros 8-10 ml de HCl 4 N/dioxano para llevar la reacción a su finalización. Al final de la reacción, se añadieron 40 ml de agua y 40 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a la reacción y se basificó la mezcla mediante la adición de una cantidad suficiente de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuosa saturada para conseguir un pH de 8-9. Se separaron las capas y se extrajo la capa acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 60 ml). Se combinaron las capas orgánicas, se lavaron con agua (4 x 10 ml, hasta que el pH del extracto acuoso en torno a la neutralidad) y salmuera, y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La concentración proporcionó un aceite ligeramente amarillo, que se purificó mediante cromatografía de media presión (CombiFlash®) en sílice (MeOH al 10-25%/diclorometano), dando el **Compuesto 5** en forma de un polvo blanco (85-95% de rendimiento) tras la trituración con hexano que contenía éter dietílico al 5-10%. El **Compuesto 5** se caracterizó mediante RMN de <sup>1</sup>H y EM-CL.

Método analítico general

Para analizar el Compuesto 5, se usaron las siguientes condiciones de CL:

25 Columna: XTerra® para EM; 18 C; 3,5 µm

Dimensiones: 2,1 x 150 mm

Gradiente: CH<sub>3</sub>CN al 75% (que contenía ácido fórmico al 0,08%)/agua al 25% (que contenía ácido fórmico al 0,1%) - CH<sub>3</sub>CN al 90% (que contenía ácido fórmico al 0,08%)/agua al 10% (que contenía ácido fórmico al 0,1%)

30 Todos los compuestos se analizaron mediante EM-CL en las siguientes condiciones de columna y fase móvil:

35 Columna: XTerra® para EM; 18 C; 3,5 µm

Dimensiones: 2,1 x 150 mm

Gradiente: Tiempo	Agua/AF al 0,1%	CH <sub>3</sub> CN/AF al 0,08%
0:00	95	5
7:00	5	95
8:00	5	95
9:00	95	5
13:00	95	5

**EJEMPLO 9. Rastreo primario Sytox**

El rastreo primario Sytox es un ensayo fenotípico que hace un seguimiento de las alteraciones producidas en la supervivencia-proliferación celular como resultado del tratamiento con compuestos. Se ideó como método de alto rendimiento para identificar compuestos que alteran específicamente el potencial de crecimiento de las células que albergan las mutaciones causales encontradas en los pacientes con cáncer, pero no afectan al crecimiento de las células normales.

El ensayo se basa en una lectura de bajo coste, simple y fiable de un colorante fluorescente impermeable a la membrana (Sytox, de Molecular Probes), que se une al ácido nucleico. En las células sanas, no se detecta señal porque la membrana celular está intacta y el colorante no entra. Sin embargo, si una membrana celular se ve comprometida como resultado de la apoptosis o la necrosis, se detectará una señal fluorescente proporcional al número de células similarmente afectadas. Mediante la utilización de una lectura de dos etapas (lectura final en presencia de detergente para permitir el marcaje de todas las células), el ensayo puede identificar los compuestos que producen citostasis, citotoxicidad y/o mitogénesis. La primera lectura o lectura de "células muertas" proporciona una estimación de la toxicidad de un compuesto dado, indicando el número de células muertas o moribundas del cultivo en el momento del ensayo. La segunda lectura o lectura de "células totales" captura tanto los efectos acumulativos de citotoxicidad en la reducción del tamaño de la población de células, como los efectos citostáticos o antiproliferativos que un compuesto de ensayo pueden ejercer sobre las células de la población de ensayo en ausencia de toxicidad.

A los efectos del rastreo, la línea BJ-TERT anteriormente descrita se define como la línea celular de referencia "normal" y las células BJ-TERT/LT/ST/RAS<sup>V12</sup> fueron la línea celular tumorigénica. Las células se sembraron durante una noche en placas de 96 pocillos a densidades que sin tratamiento permitirían una confluencia del 95% en los pocillos 72 horas más tarde. Al día siguiente, se expusieron las células a los compuestos de prueba en una serie de diluciones durante un período de 48 horas. Después de este período de incubación, se añadió el reactivo Sytox a los cultivos a la concentración recomendada por el fabricante y se realizó la lectura de la fluorescencia de las células muertas. Una vez finalizada esta medición, se añadió el detergente saponina a cada pocillo de los cultivos para permeabilizar las membranas permitiendo que el reactivo Sytox entrara en cada célula, facilitando de ese modo la medición del número total de células que quedan en el cultivo.

Para la evaluación de los datos, no se hizo distinción entre los compuestos que mostraron efectos citotóxicos o citostáticos. Con el fin de tenerlos en cuenta para pruebas posteriores, los compuestos debían cumplir dos criterios estrictos:

- i. producir un cambio en la señal de al menos 2 órdenes de magnitud de la desviación estándar en las líneas de células tumorales, bien en la lectura de células muertas o en la de células totales (o en ambas);
- ii. producir un cambio en la señal de menos de un orden de magnitud de la desviación estándar en las células de control "normales".

Véanse las Tablas 3 y 4, y las Figuras 15-17 para los datos *in vitro* correspondientes a los compuestos de la invención.

Tabla 3

Código del compuesto	CI <sub>50</sub> en BJELR (µM)
5*	< 0,100
6	≥ 1,000
7	≥ 0,100
8	≥ 1,000
9	≥ 1,000
14	≥ 0,100
15	≥ 1,000
10	≥ 1,000
11	≥ 0,100
16	≥ 0,100
17	≥ 0,100
12	< 0,100
13	< 0,100
* de acuerdo con la invención	

Tabla 4

Nombre de la línea celular	Tipo de célula	VDAC2 y 3	Estado de Ras	Compuesto 5: CI <sub>50</sub> (nM)
MCF7	de mama	+	vía activada	≥ 1000
BT-549	de mama	+	vía activada	≥ 100
COLO 205	de colon	+	Mut V600E de B-raf, ras de tipo natural	
SW-620	de colon	+	mutación G12V de K-ras, B-raf de tipo natural	
DLD-1	de colon		mutación G13D de K-ras, B-raf de tipo natural, positivo para la expresión del antígeno p53 (el antígeno p53 producido tiene una mutación C → T que produce Ser → Phe en la posición 241)	≥ 100
LS174T	de colon		Mutación G12D de K-ras2	
HCT116	de colon		G12D de K-ras	≥ 100
HT1080	fibrosarcoma		mutación n-ras	< 100
MALME-3M	melanoma	+	mut V600E de B-raf, ras de tipo natural	≥ 100
SK-MEL-28	melanoma	+	mut V600E de B-raf, ras de tipo natural	≥ 100
SK-MEL-5	melanoma	+	mut V600E de B-raf heterocigoto	≥ 100
A375	melanoma		ras de tipo natural, MEK1 activa constit.	
HOP-62	de pulmón de células pequeñas	+	G12V de K-ras	≥ 100
HOP-92	de pulmón de células pequeñas	+	ras de tipo natural	≥ 1000
NCI-H322M	de pulmón de células pequeñas	+		
OVCAR-3	de ovario	+	amplificación de K-ras	≥ 100
SK-OV-3	de ovario	+		≥ 100
OVCAR-5	de ovario	+	G12V de K-ras	<100
DU-145	de próstata	+	ras de tipo natural	≥ 100
PC-3	de próstata	+		≥ 1000
BJEH	fibroblasto, primaria	+	normal	
BJELR	fibroblasto, primaria	+	mutación V12 de ras y normal	<100
PANC-1	de páncreas		mutante V12 de K-ras	<100
MIA-PaCa-2	de páncreas		mutante K-ras (G12C)	<100 ≥ 1000

#### EJEMPLO 10. Estudio de tratamiento de tumores HT-1080: Evaluación de la actividad antitumoral del Compuesto 6 PRLX y del Compuesto 5 PRLX

5

##### Cepa murina:

ratones atímicos Balb/c (cepa Nu/Nu, Charles River Laboratories), hembra, 5-6 semanas de vida (~ 20 g de peso corporal medio).

10

##### Formulación de los artículos del ensayo:

Ambos compuestos se formularon de una manera idéntica. Para el nivel de dosis de 100 mg/kg, se administró cada compuesto a una concentración de 10,0 mg/ml en un volumen de inyección de 0,2 ml. Para el nivel de dosis de 50 mg/kg, cada compuesto se administró a una concentración de 5,0 mg/ml, en un volumen de inyección de 0,2 ml. Para ambos niveles de dosis, el vehículo contenía Tween-80 al 0,025%, alcohol bencílico al 0,01%, ácido acético 35 mM (HOAc), tampón de fosfato potásico 100 mM y sacarosa 32 mM, pH = 6,5.

15

##### Grupos de estudio:

20

- A: Compuesto 6 PRLX a 100 mg/kg, QD x 5 días, IP, n = 8.
- B: Compuesto 6 PRLX a 50 mg/kg, QD x 5 días, IP, n = 8.
- C: Compuesto 5 PRLX a 100 mg/kg, QD x 5 días, IP, n = 8.
- D: Compuesto 5 PRLX a 50 mg/kg, QD x 5 días, IP, n = 8.

E: Control de vehículo, QD x 5 días, IP, n = 8  
 F: Control sin tratar, n = 8.

Plan de tratamiento:

5 Comenzando cuando el volumen medio del tumor alcanzó ~ 200 mm<sup>3</sup>, y continuando hasta el día 5, todos los días, se administró a cada animal una sola inyección IP de uno de los tratamientos anteriores para un total de 5 dosis.

Implantes tumorales y puesta en práctica:

10 Se implantaron 1 x 10<sup>7</sup> células HT-1080 a cada uno de los 70 ratones mediante una inyección SC de 0,1 cc de inóculo en el lado trasero derecho. Se usó un tamaño de aguja de calibre 25 x 5/8". El inóculo de células tumorales se preparó usando células RT-1080 (aislado de ATCC, solución madre de congelador del 6º paso) que se habían cultivado en DMEM [Gibco, n ° 10569-010] + SFC al 10% [Gibco, n ° F-2442]. En el momento de la recogida de las  
 15 células, las células habían crecido hasta un 95-100% de confluencia. Se preparó inóculo de HT-1080 en medio estéril DMEM + SFC al 10% a una densidad de 1,0 x 10<sup>8</sup> células/ml. Al noveno día del implante del tumor, se asignaron los animales a grupos de tratamiento y de control, consistiendo cada grupo en 8 ratones. Se excluyó un total de 22 valores anómalos del estudio debido a tumores que eran demasiado pequeños o demasiado grandes. Este día se consideró el día 1 del estudio, y el tratamiento se inició ese día.

Preparación de soluciones para inyección:

Se prepararon las siguientes soluciones para inyección cada uno de los 5 días de la administración de los compuestos:

*dosis de 100 mg/kg (grupos A y C)*

En primer lugar, se preparó una solución madre de 100 mg/ml para cada compuesto mediante la disolución de 35 mg de PRLX, compuesto 6, o de compuesto 5 PRLX en 0,35 ml de disolvente (Tween-80 al 0,25%, alcohol bencílico al 0,1% y ácido acético 350 mM). A continuación, se prepararon las soluciones para inyección finales mediante la dilución de las soluciones madre resultantes 1:10, mezclando cada una con 3,15 ml de diluyente (tampón de fosfato de potasio 100 mM y sacarosa 32 mM, pH 6,8). Luego se esterizaron las soluciones mediante filtración (membrana de 0,45 µm). Las soluciones resultantes contenían compuesto 6 PRLX o compuesto 5 PRLX a una concentración final de 10,0 mg/ml, pH = 6,5.

*dosis de 50 mg/kg (grupos B y D)*

Para cada uno de los dos compuestos, se diluyó 1:2 1,0 ml de las soluciones para inyección de 10 mg/ml (descritas anteriormente) mediante la adición de 1,0 ml de diluyente (tampón de fosfato de potasio 100 mM y sacarosa 32 mM, pH 6,8). Las soluciones resultantes contendrán una concentración final de compuesto 6 PRLX o de compuesto 5 PRLX de 5,0 mg/ml a pH = 6,5.

*Vehículo de control (grupo E)*

45 El vehículo de control se preparó diluyendo el disolvente (Tween-80 al 0,25%, alcohol bencílico al 0,1% y ácido acético 350 mM) 1:10 usando el diluyente (tampón fosfato de potasio 100 mM y sacarosa 32 mM, pH 6,8). La composición final del vehículo de control contenía Tween-80 al 0,25%, alcohol bencílico al 0,01% y HOAc 35 mM, en fosfato de potasio 100 mM y sacarosa 32 mM, con un pH final = 6,8.

Resumen de la dosificación

Grupo de estudio	Tratamiento	Concentración de la solución para inyección	Cantidad de compuesto dada (mg)	Volumen de la solución para inyección dado
A	Compuesto 6 PRLX a 100	10,0 mg/ml	2,0	0,2 ml
B	Compuesto 6 PRLX a 50	5,0 mg/ml	1,0	0,2 ml
C	Compuesto 5 PRLX a 100	10,0 mg/ml	2,0	0,2 ml
D	Compuesto 5 PRLX a 50	5,0 mg/ml	1,0	0,2 ml
E	Vehículo de control	0 mg/ml	Solo vehículo	0,2 ml
F	Control sin tratar	0	0	0

Medición de los tumores:

5 Comenzando el día 1, se pesaron todos los animales y se midieron las dimensiones de los tumores (longitud (L) y anchura (W)) cada dos días. Luego se convirtieron las medidas de los tumores en el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) usando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen tumoral} = L \times W \times W/2$$

10 Se calculó la media de los valores de volumen tumoral resultantes para cada grupo de estudio en cada punto temporal, y luego se representaron gráficamente frente al tiempo. La varianza se expresó como el error estándar de la media ( $\pm$  EEM).

Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 18-20.

15 **EJEMPLO 11. Estudio de tratamiento de tumores PANC-1: Evaluación de la actividad antitumoral del Compuesto 6 PRLX y del Compuesto 5 PRLX**

Preparación e implante de xenoinjertos PANC-1

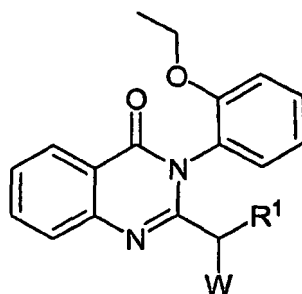
20 El plan experimental para el estudio de PANC-1 fue esencialmente idéntico al del estudio de HT-1080 descrito anteriormente en el Ejemplo 10 con las siguientes excepciones: el fragmento de aproximadamente 30-40 mg de tejido tumoral de PANC-1 pasado se implantó subcutáneamente en el lado derecho de un ratón atímico inmunodeficiente. Se hizo un seguimiento diario del crecimiento tumoral, y cuando los tumores alcanzaron aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$ , se agruparon los animales portadores de tumores de tamaño similar y se inició la  
25 administración de los compuestos. La administración del compuesto 5 se realizó una vez al día durante cinco días consecutivos a las dosis enumeradas a continuación. En los xenoinjertos PANC-1, se usó gemcitabina como control, administrada a la dosis máxima tolerada para el modelo. La pauta de dosificación de la gemcitabina fue de  $180 \text{ mg/kg}$  tres veces al día cada tres días durante un periodo de 9 días.

30 Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 21-22.



## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene una estructura de Fórmula I o una de sus sales farmacéuticamente aceptables



(I)

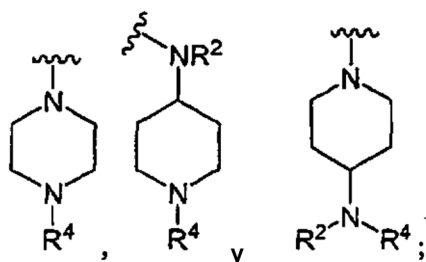
5 en la que:

$R^1$  se selecciona entre H, -Z-Q-Z, -alquil  $C_{1-8}$ -N( $R^2$ )( $R^4$ ), -alquil  $C_{1-8}$ -OR<sup>3</sup>, resto carbocíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, arilo, heteroarilo y aralquilo  $C_{1-4}$ ;

10 cada  $R^2$  y  $R^4$  se selecciona independientemente para cada aparición entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo, heteroarilo, acilo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo, con la condición de que cuando tanto  $R^2$  como  $R^4$  estén en el mismo átomo de N y ninguno sea H, estos sean diferentes, y que cuando tanto  $R^2$  como  $R^4$  estén en el mismo N y bien  $R^2$  o  $R^4$  sea acilo, alquilsulfonilo o arilsulfonilo, entonces el otro se seleccione entre H, alquilo  $C_{1-8}$ , arilo, aralquilo  $C_{1-4}$  y heteroarilo;

$R^3$  se selecciona entre H, alquilo  $C_{1-4}$ , aralquilo  $C_{1-4}$ , arilo y heteroarilo;

15 W se selecciona entre:



20 Q se selecciona entre O y NR<sup>2</sup>; y

Z se selecciona independientemente para cada aparición entre alquilo  $C_{1-6}$ , alqueno  $C_{2-6}$  y alquino  $C_{2-6}$ ; en la que arilo está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo  $C_{1-6}$ , CF<sub>3</sub>, hidroxilo, alcoxilo  $C_{1-4}$ , arilo, ariloxilo, halógeno, -NR<sup>2</sup>R<sup>4</sup>, nitro, ácido carboxílico y éster carboxílico; y en la que el término "alquilo" se refiere al radical de grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo (alíclicos), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo;

25 el término "alqueno" se refiere a un grupo alifático que contiene al menos un enlace doble;

el término "alquino" se refiere a un grupo alifático que contiene al menos un enlace triple;

30 el término "arilo", como se usa en la presente memoria, incluye grupos aromáticos de un solo anillo en los que cada átomo del anillo es carbono, y sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en los que al menos uno de los anillos es aromático;

el término "heteroarilo" incluye estructuras de un solo anillo aromático, cuyas estructuras anulares incluyen al menos un heteroátomo y sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en los que al menos uno de los anillos es heteroaromático;

35 el término "hidrocarbilo" se refiere a un grupo que está unido a través de un átomo de carbono que no tiene un sustituyente = O o =S y que opcionalmente puede incluir heteroátomos;

el término "acilo" se refiere a un grupo representado por la fórmula general hidrocarbilo-C(O)-; El término "éster" se refiere a un grupo -C(O)OR<sup>9</sup>, en el que R<sup>9</sup> representa un grupo hidrocarbilo; para tratar el cáncer.

40 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto destruye las células cancerosas de un mamífero mediante un mecanismo no apoptótico.

3. El compuesto de la reivindicación 2, en el que dichas células tienen una actividad de señalización de Ras aumentada.

45

4. El compuesto de la reivindicación 2, en el que dichas células sobreexpresan el antígeno T pequeño de SV40.
5. El compuesto de la reivindicación 2, en el que dichas células tienen una actividad sustancialmente reducida de la fosfatasa PP2A.
- 5 6. El compuesto de la reivindicación 2, en el que dichas células sobreexpresan VDAC.
7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el arilo está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo C<sub>1-6</sub>, CF<sub>3</sub>, hidroxilo, alcoxilo C<sub>1-4</sub>, arilo, ariloxilo, halógeno, NR<sup>2</sup>R<sup>4</sup>, nitro, ácido carboxílico y éster carboxílico.
- 10 8. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R<sup>1</sup> se selecciona entre Z-Q-Z, -alquil C<sub>1-8</sub>-N(R<sup>2</sup>)(R<sup>4</sup>), -alquil C<sub>1-8</sub>-OR<sup>3</sup>, arilo, heteroarilo y aralquilo C<sub>1-4</sub>.
- 15 9. El compuesto de la reivindicación 8, en el que R<sup>4</sup> se selecciona entre aralquilo C<sub>1-4</sub> y acilo.
10. El compuesto de la reivindicación 9, en el que R<sup>4</sup> es acilo.
11. El compuesto de la reivindicación 10, en el que R<sup>4</sup> es -C(O)-alquil C<sub>1-3</sub>-Y e Y se selecciona entre H, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, arilo, heteroarilo, heteroariloxilo y cicloalquilo.
- 20 12. Uso de
- (1) un compuesto que tiene la estructura de Fórmula I o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según lo definido en la reivindicación 1;
- 25 y
- (2) un agente que aumenta la abundancia de VDAC en la célula para la preparación de una composición farmacéutica para destruir una célula, potenciar la muerte celular o inhibir la proliferación celular.
- 30 13. El uso de la reivindicación 12, en el que la VDAC es VDAC1, VDAC2 o VDAC3.
14. El uso de la reivindicación 12, en el que dicha célula es una célula cancerosa.
- 35 15. El uso de la reivindicación 12, en el que dicho agente comprende un polinucleótido que codifica VDAC.
16. El uso de la reivindicación 12, en el que dicho agente es una proteína VDAC adaptada a ser transportada en la célula.
- 40 17. El uso de la reivindicación 16, en el que dicho agente es una proteína VDAC fusionada con un dominio de internalización heterólogo.
18. El uso de la reivindicación 16, en el que dicho agente es una preparación de liposomas que comprende una proteína VDAC.
- 45 19. El uso de la reivindicación 12, en el que dicho agente aumenta o inhibe la expresión de VDAC endógena.
20. El uso de la reivindicación 19, en el que dicho agente estimula la expresión de VDAC.
- 50 21. El uso de la reivindicación 19, en el que dicho agente inhibe la función de un inhibidor de VDAC.
22. El uso de la reivindicación 12, en el que el arilo está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo C<sub>1-6</sub>, CF<sub>3</sub>, hidroxilo, alcoxilo C<sub>1-4</sub>, arilo, ariloxilo, halógeno, NR<sup>2</sup>R<sup>4</sup>, nitro, ácido carboxílico y éster carboxílico.
- 55 23. El uso de la reivindicación 12, en el que R<sup>1</sup> se selecciona entre Z-Q-Z, -alquil C<sub>1-8</sub>-N(R<sup>2</sup>)(R<sup>4</sup>), -alquil C<sub>1-8</sub>-OR<sup>3</sup>, arilo, heteroarilo y aralquilo C<sub>1-4</sub>.
24. El uso de la reivindicación 23, en el que R<sup>4</sup> se selecciona entre aralquilo C<sub>1-4</sub> y acilo.
- 60 25. El uso de la reivindicación 24, en el que R<sup>4</sup> es acilo.
26. El uso de la reivindicación 25, en el que R<sup>4</sup> es -C(O)-alquil C<sub>1-3</sub>-Y e Y se selecciona entre H, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, arilo, heteroarilo, heteroariloxilo y cicloalquilo.

27. Uso de

(1) un compuesto que tiene la estructura de Fórmula I o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según lo definido en la reivindicación 1;

5 y  
(2) un agente que disminuye la abundancia de VDAC en la célula para la preparación de una composición farmacéutica para destruir una célula, potenciar la muerte celular o inhibir la proliferación celular.

10 28. Un compuesto que tiene la estructura de Fórmula I o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según lo definido en la reivindicación 1.

15 29. El compuesto de la reivindicación 28, en el que el arilo está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo C<sub>1-6</sub>, CF<sub>3</sub>, hidroxilo, alcoxilo C<sub>1-4</sub>, arilo, ariloxilo, halógeno, NR<sup>2</sup>R<sup>4</sup>, nitro, ácido carboxílico y éster carboxílico.

30. El compuesto de la reivindicación 28, en el que R<sup>1</sup> se selecciona entre Z-Q-Z, -alquil C<sub>1-8</sub>-N(R<sup>2</sup>)(R<sup>4</sup>), -alquil C<sub>1-8</sub>-OR<sup>3</sup>, arilo, heteroarilo y aralquilo C<sub>1-4</sub>.

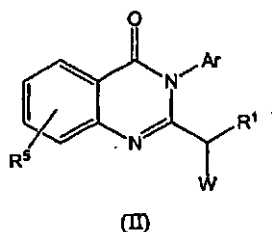
20 31. El compuesto de la reivindicación 30, en el que R<sup>4</sup> se selecciona entre aralquilo C<sub>1-4</sub> y acilo.

32. El compuesto de la reivindicación 31, en el que R<sup>4</sup> es acilo.

25 33. El compuesto de la reivindicación 32, en el que R<sup>4</sup> es -C(O)-alquil C<sub>1-3</sub>-Y e Y se selecciona entre H, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, arilo, heteroarilo, heteroariloxilo y cicloalquilo.

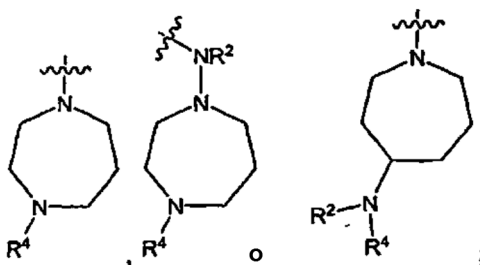
34. Un compuesto que tiene la estructura de Fórmula I o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según lo definido en la reivindicación 1 para destruir una célula, potenciar la muerte celular o inhibir la proliferación celular.

30 35. Un método *in vitro* para destruir una célula, potenciar la muerte celular o inhibir la proliferación celular que comprende administrar a la célula una cantidad eficaz de un compuesto que tiene una estructura de Fórmula II o una de sus sales farmacéuticamente aceptables,



en la que

35 Ar es un fenilo sustituido;  
R<sup>1</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1-8</sub>; -Z-Q-Z, -alquil C<sub>1-8</sub>-N(R<sup>2</sup>)(R<sup>4</sup>), -alquil C<sub>1-8</sub>-OR<sup>3</sup>, resto carbocíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, arilo, heteroarilo y aralquilo C<sub>1-4</sub>;  
cada R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> se selecciona independientemente para cada aparición entre H, alquilo C<sub>1-4</sub>, aralquilo C<sub>1-4</sub>, arilo, heteroarilo, acilo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo, con la condición de que cuando ambos R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> estén en el mismo N y bien R<sup>2</sup> o R<sup>4</sup> sea acilo, alquilsulfonilo o arilsulfonilo, entonces el otro se seleccione entre H, alquilo C<sub>1-8</sub>, arilo, aralquilo C<sub>1-4</sub>, arilo y heteroarilo;  
40 R<sup>3</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1-4</sub>, aralquilo C<sub>1-4</sub>, arilo y heteroarilo;  
R<sup>5</sup> representa 0-4 sustituyentes en el anillo al que está unido seleccionados entre halógeno y nitro;  
W es



45 Q se selecciona entre O y NR<sup>2</sup>; y  
Z se selecciona independientemente para cada aparición entre alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> y alquino C<sub>2-6</sub>;  
y en la que arilo está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo C<sub>1-6</sub>, CF<sub>3</sub>, hidroxilo, alcoxilo C<sub>1-4</sub>, arilo, ariloxilo, halógeno, -NR<sup>2</sup>R<sup>4</sup>, nitro, ácido carboxílico y éster carboxílico;

y en la que

el término "alquilo" se refiere al radical de grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo (alícíclicos), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo;

5 el término "alqueno" se refiere a un grupo alifático que contiene al menos un enlace doble;

el término "alquino" se refiere a un grupo alifático que contiene al menos un enlace triple;

el término "arilo", como se usa en la presente memoria, incluye grupos aromáticos de un solo anillo en los que cada átomo del anillo es carbono y sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en los que al menos uno de los anillos es

10 aromático;

el término "heteroarilo" incluye estructuras de un solo anillo aromático, cuyas estructuras anulares incluyen al menos un heteroátomo, y sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en los que al menos uno de los anillos es

15 heteroaromático;

el término "hidrocarbilo" se refiere a un grupo que está unido a través de un átomo de carbono que no tiene un sustituyente = O o =S y que opcionalmente puede incluir heteroátomos;

el término "acilo" se refiere a un grupo representado por la fórmula general hidrocarbilo-C(O)-;

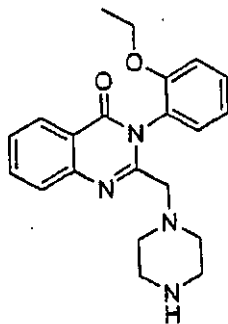
el término "éster" se refiere a un grupo -C(O)OR<sup>9</sup> en el que R<sup>9</sup> representa un grupo hidrocarbilo.

20 36. Los compuestos de la reivindicación 28 para aumentar la sensibilidad de una célula tumoral o de una célula normal hacia un agente quimioterapéutico.

37. Los compuestos de la reivindicación 28 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para tratar el cáncer en un mamífero.

25

38. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene una estructura:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

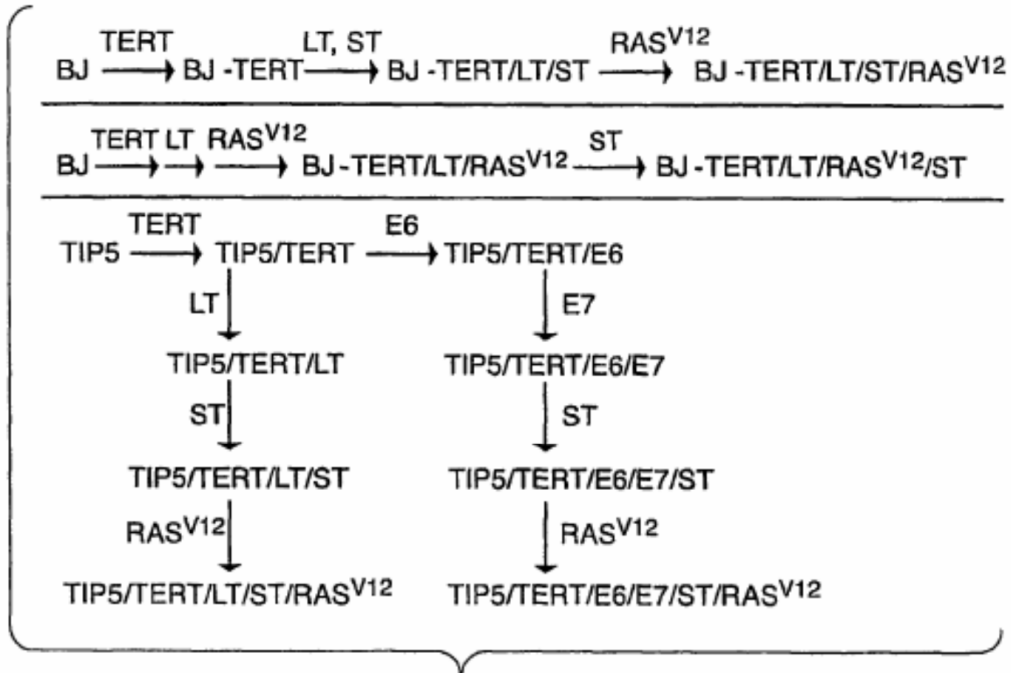
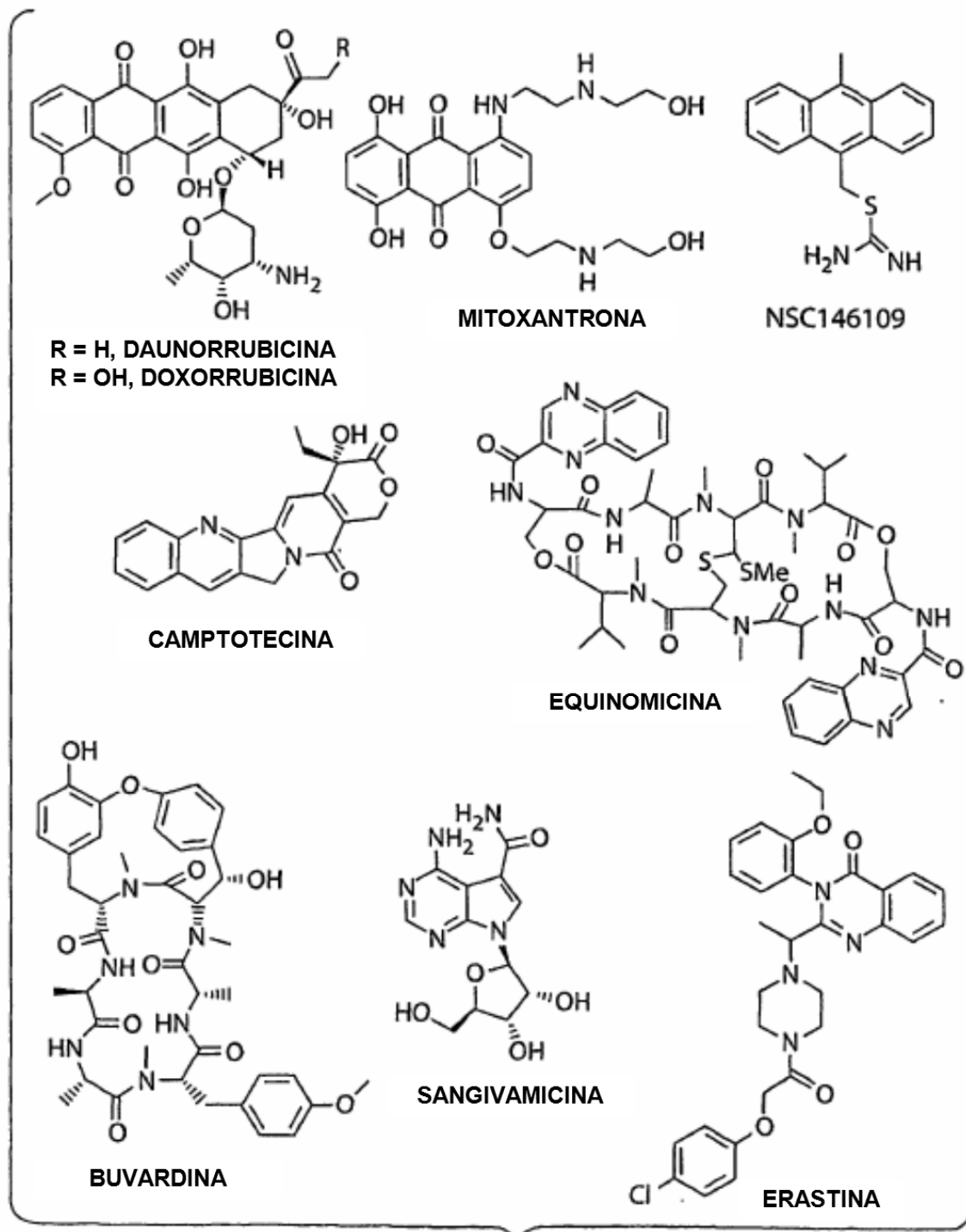
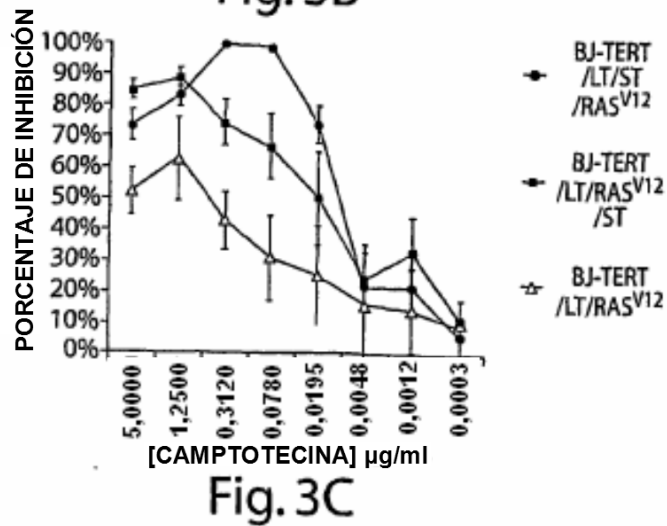
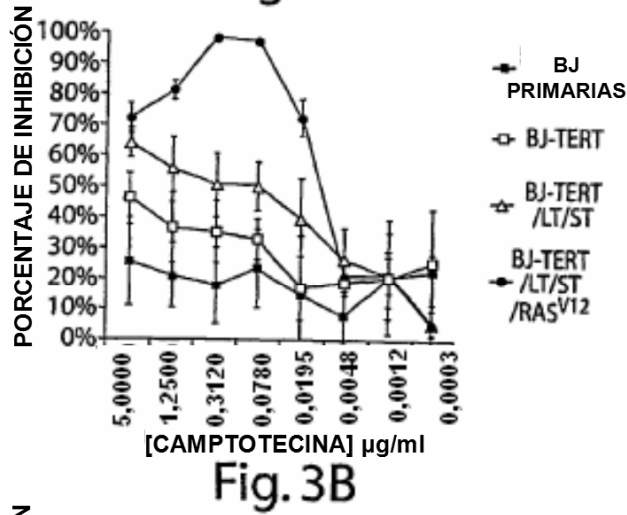
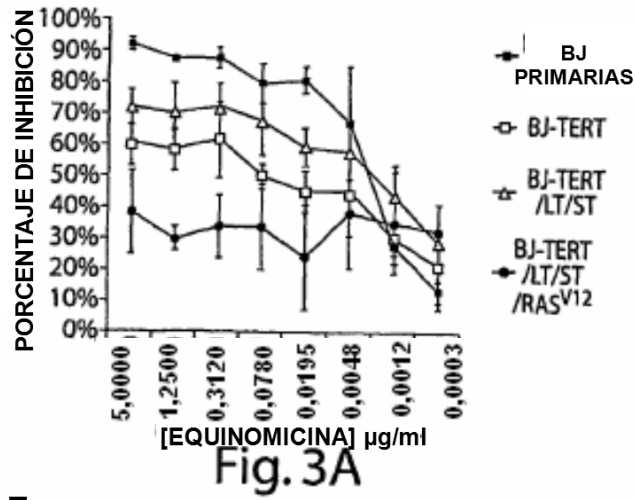


Fig. 1



**Fig. 2**



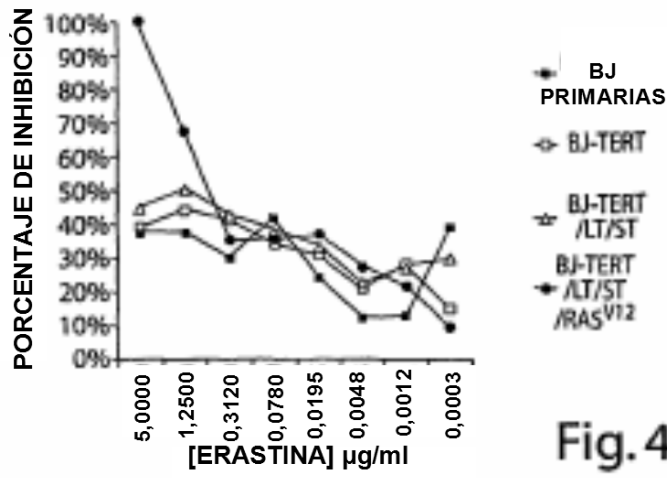


Fig. 4A

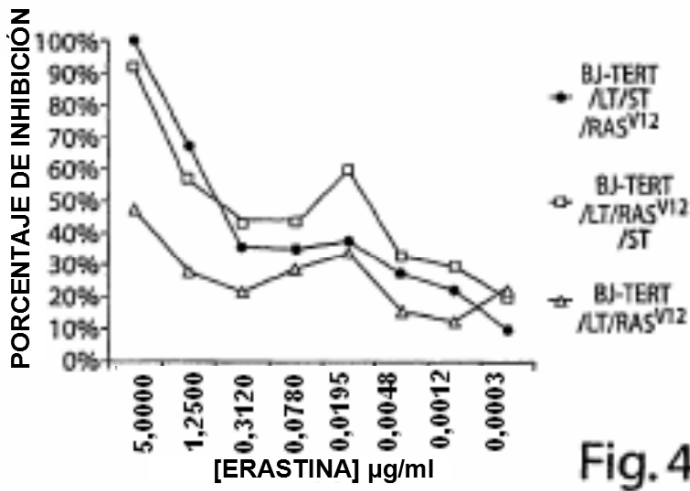


Fig. 4B

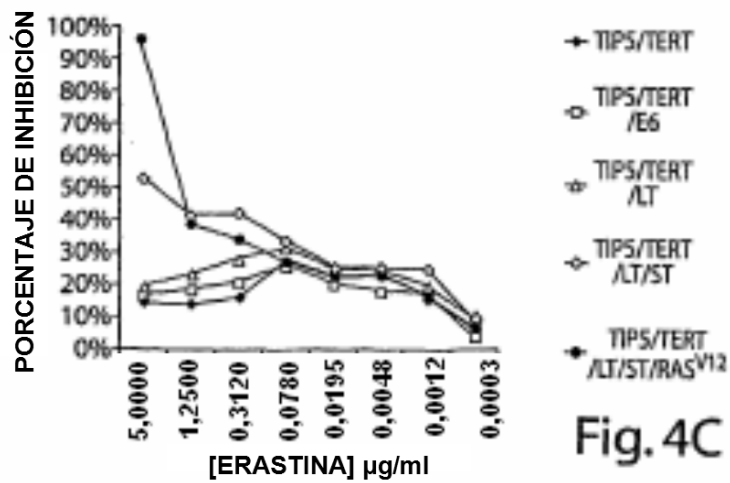


Fig. 4C



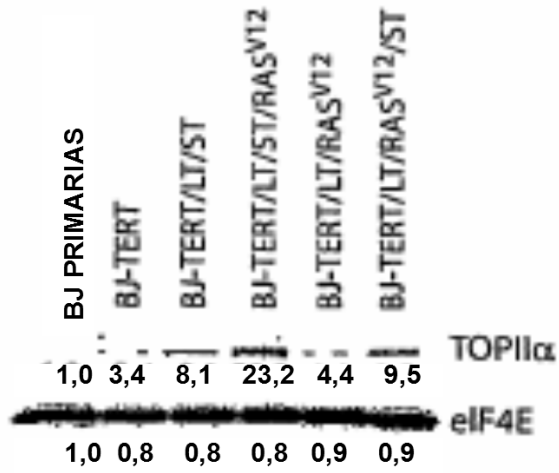


Fig. 5A

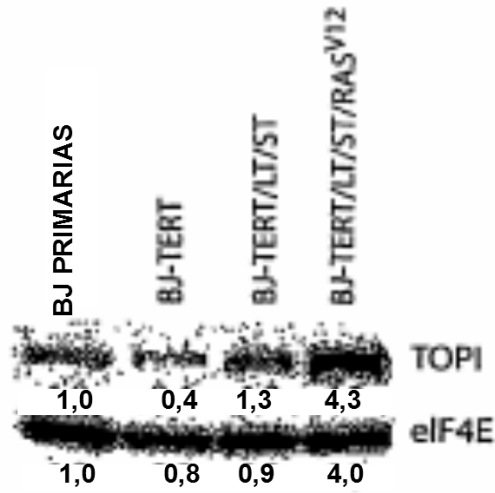


Fig. 5B

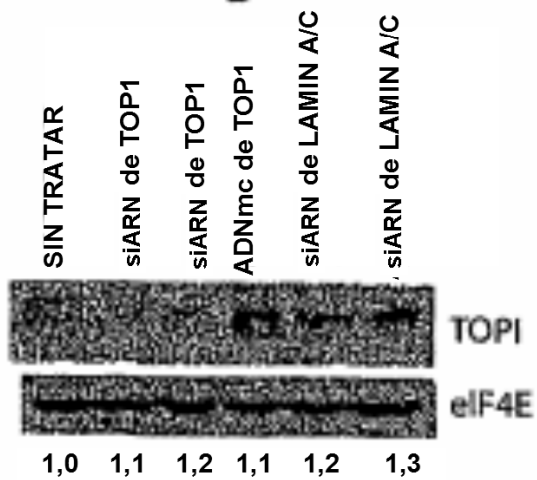


Fig. 5C

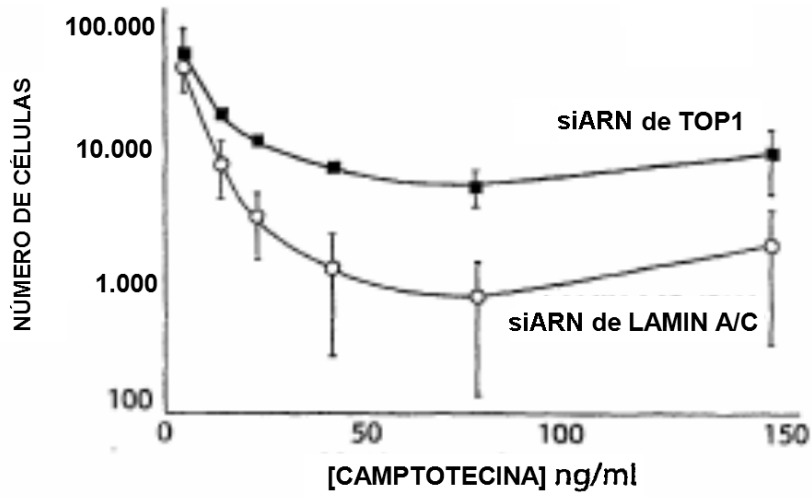


Fig. 5D

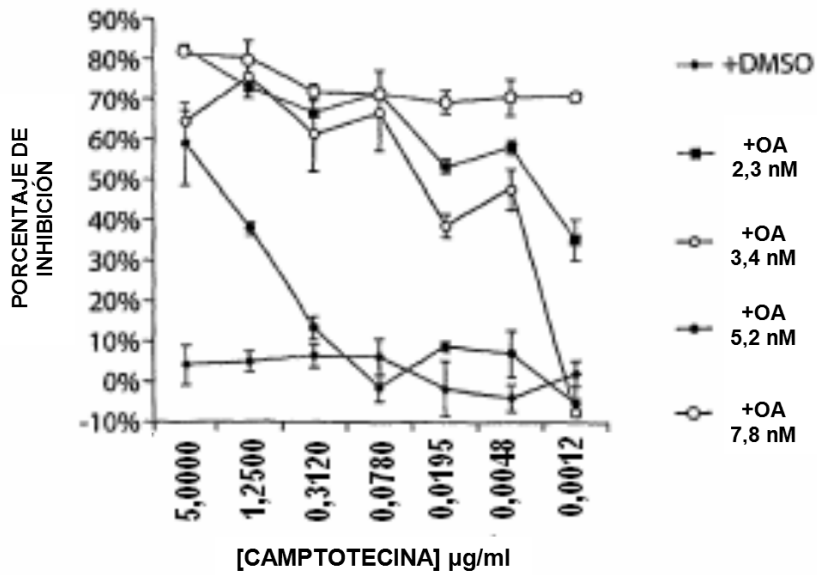


Fig. 5E

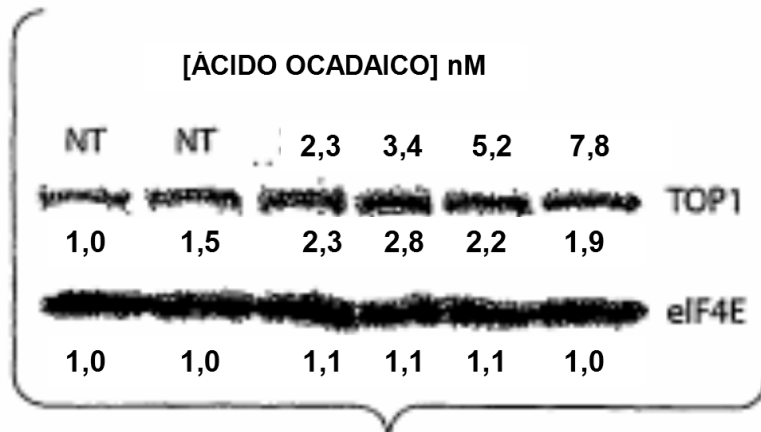


Fig. 5F

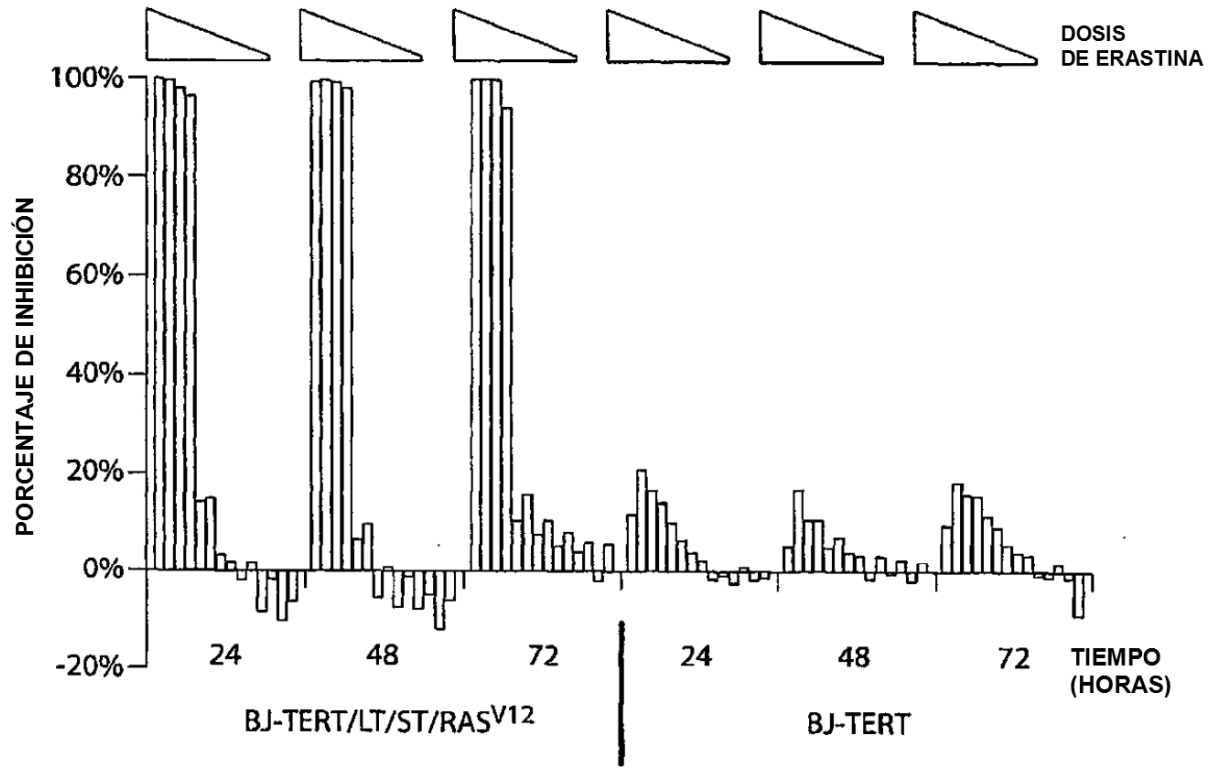


Fig. 6A

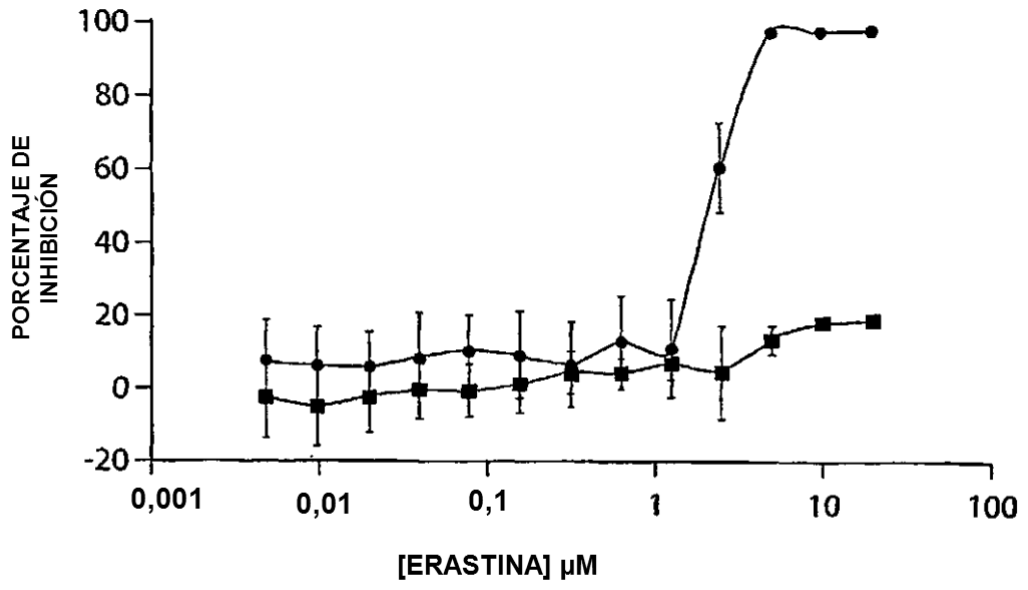


Fig. 6B

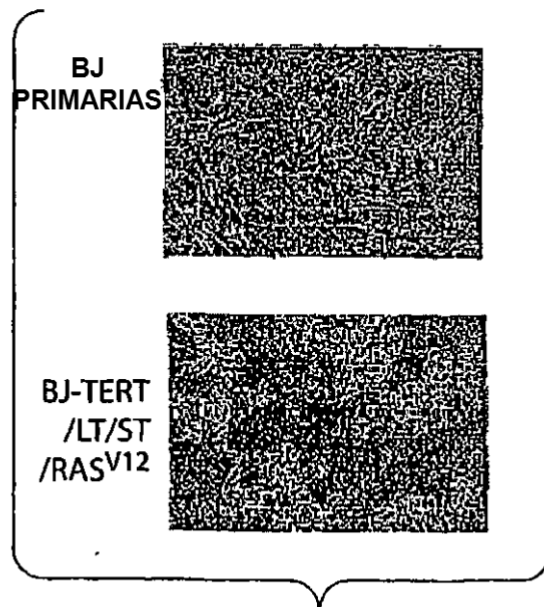
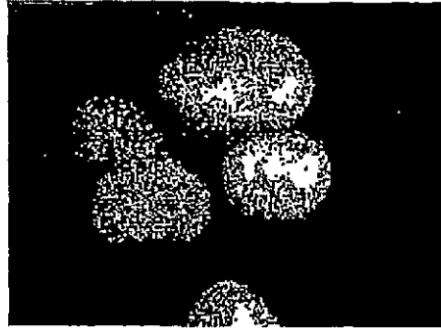


Fig. 6C

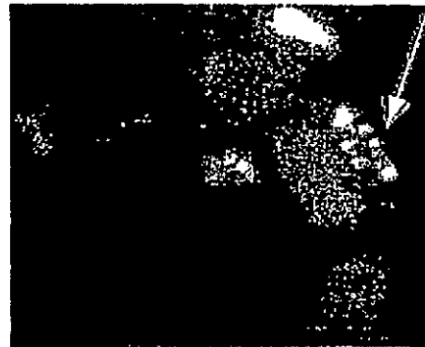
Fig. 7A



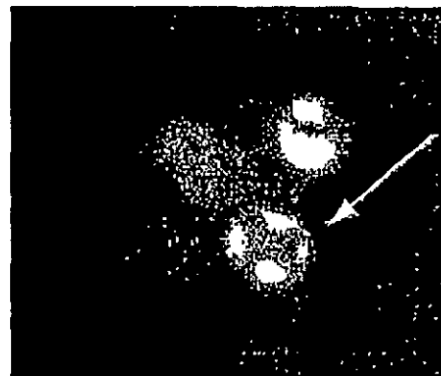
SIN TRATAMIENTO



ERASTINA



CAMPTOTECINA



CAMPTOTECINA

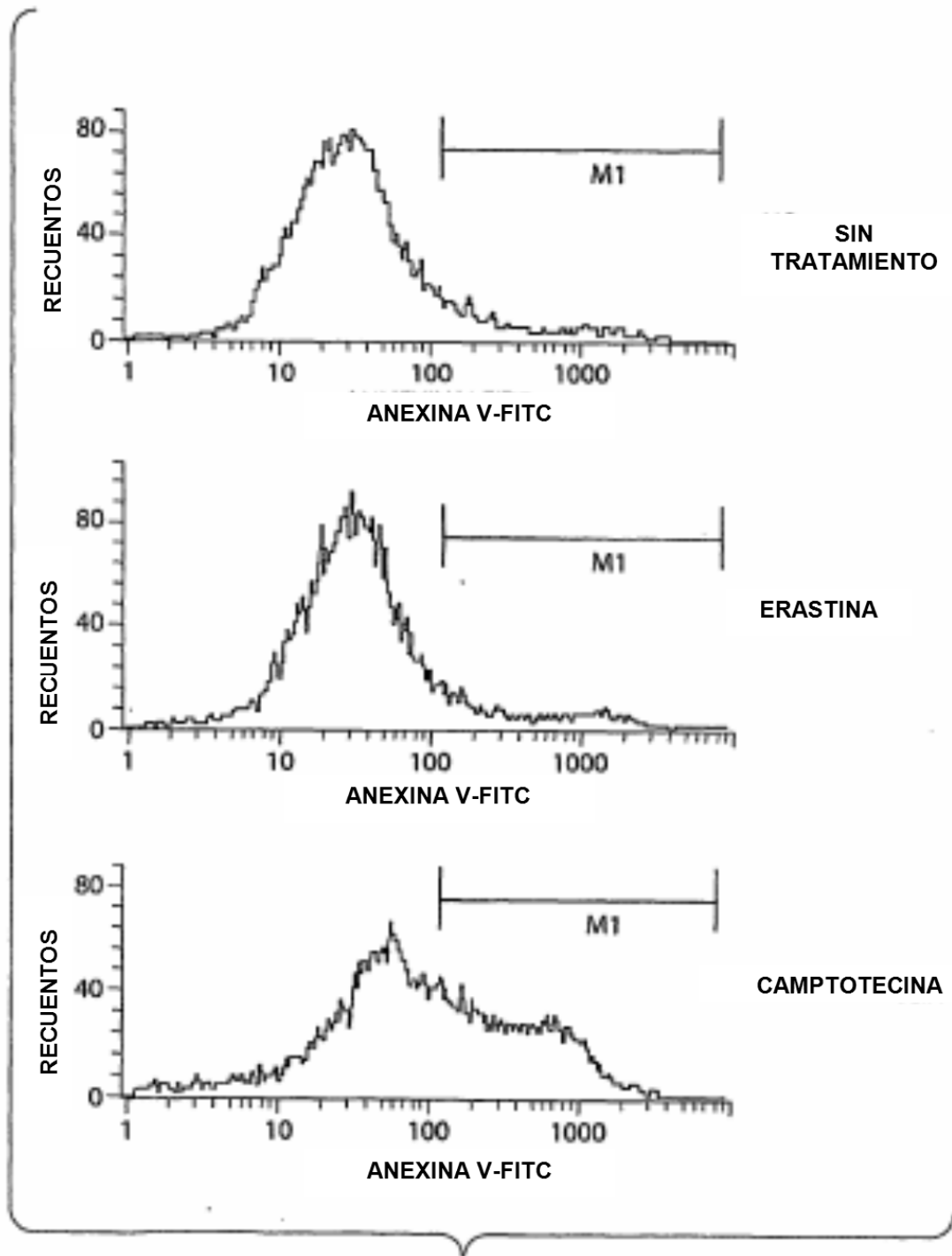


Fig. 7B

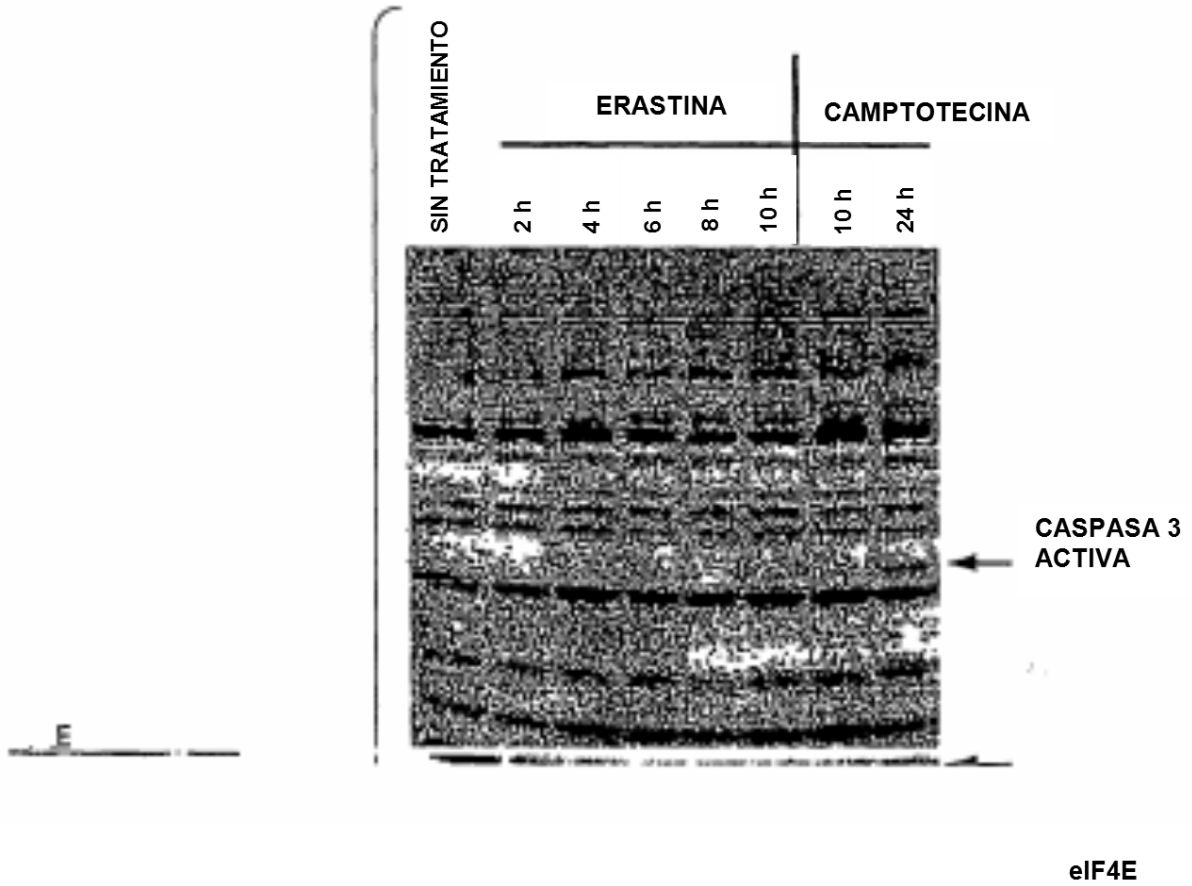


Fig. 7C



RELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD Y ESTRUCTURA DE LA ERASTINA

- 135 ANÁLOGOS DE ERASTINA ANALIZADOS EN CUANTO A LA ACTIVIDAD Y LA SELECTIVIDAD (TUMORALES FRENTE A NORMALES)
- 134 FUERON INACTIVOS
- 1 FUJE ACTIVO Y SELECTIVO, PERO MENOS POTENTE QUE LA ERASTINA

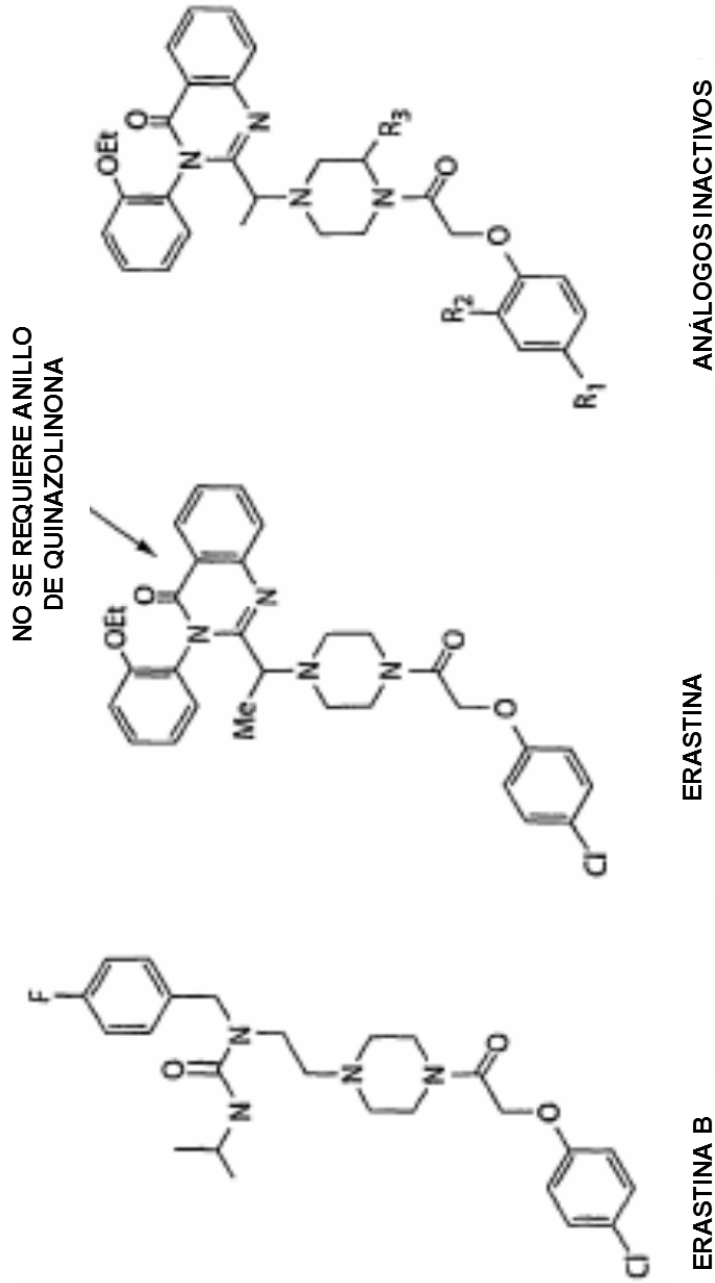


Fig.8

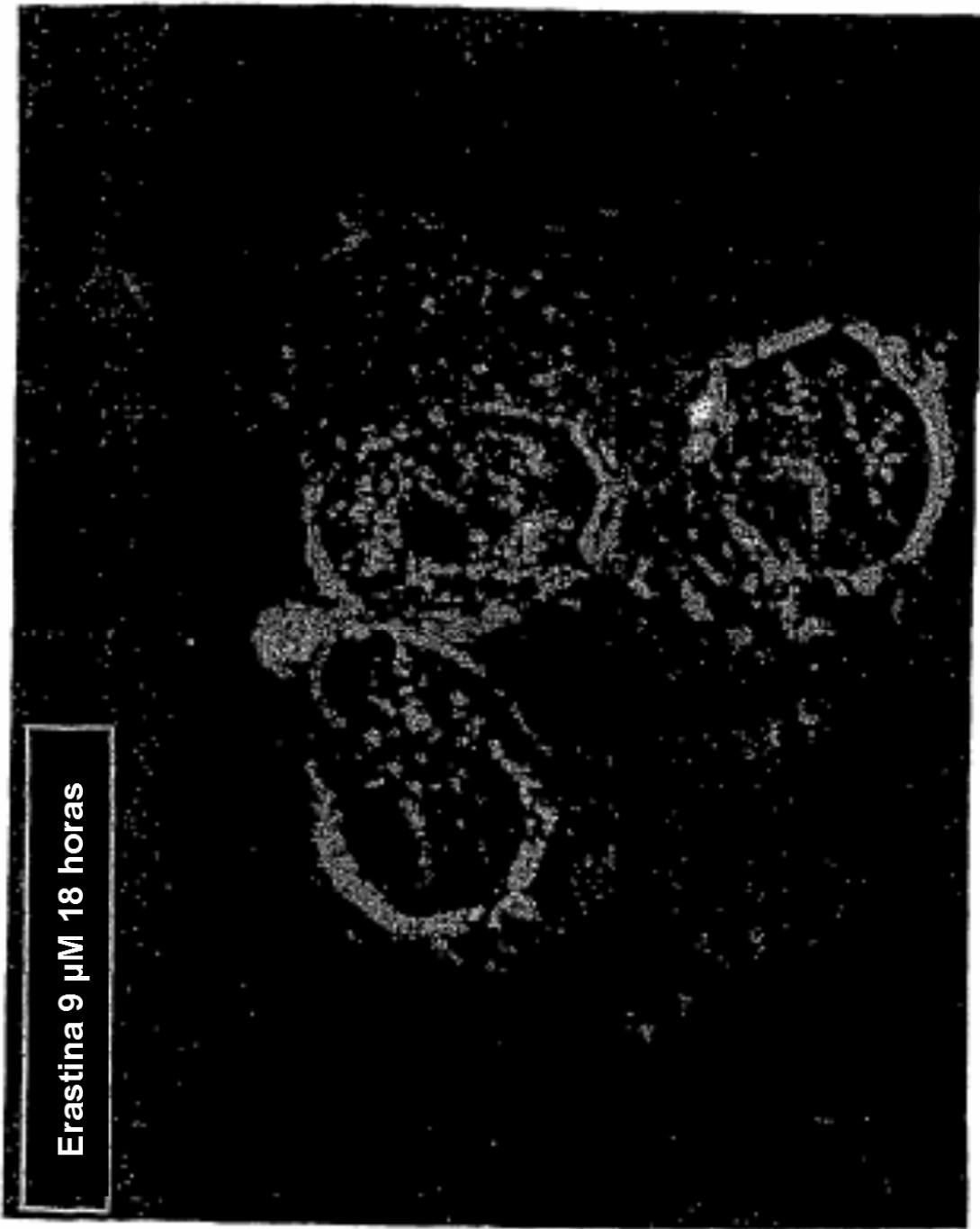


Fig. 9

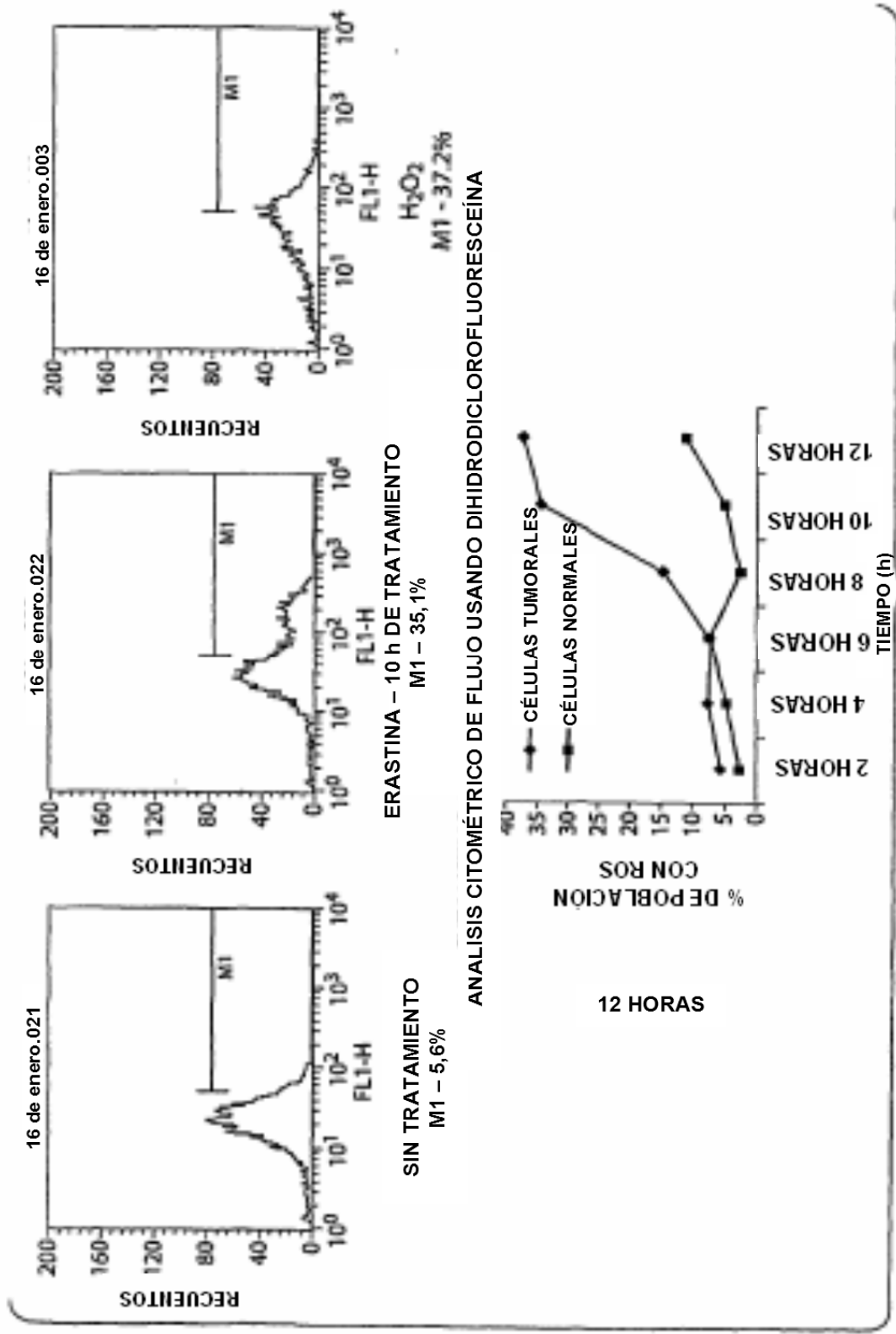


Fig.10

Erastina A

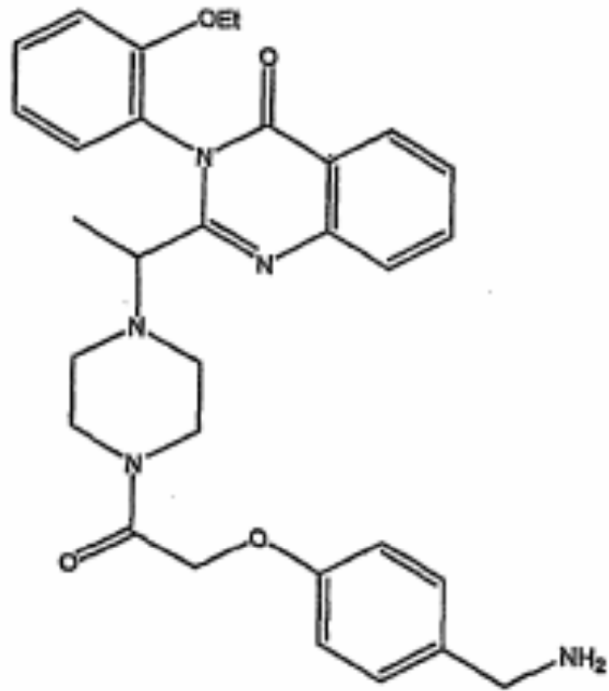


Fig. 11

NIVELES DE TRANSCRIPTOS RELATIVOS EN CÉLULAS bJELR Y bJEH

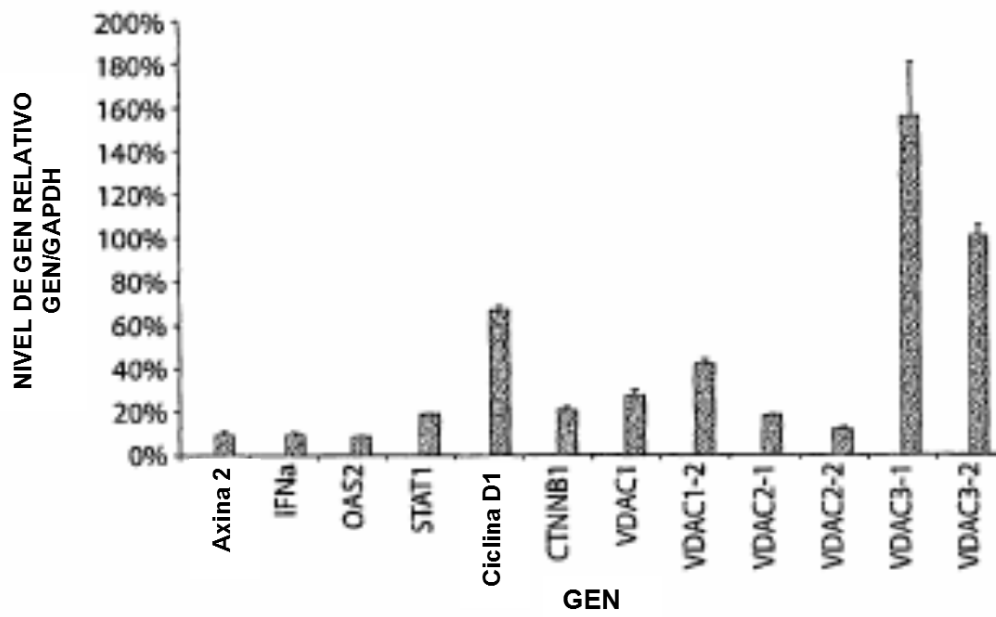


Fig. 12

NIVELES DE TRANSCRIPTOS DE ISOFORMAS DE VDAC RELATIVOS EN CÉLULAS bJEH Y bJELR

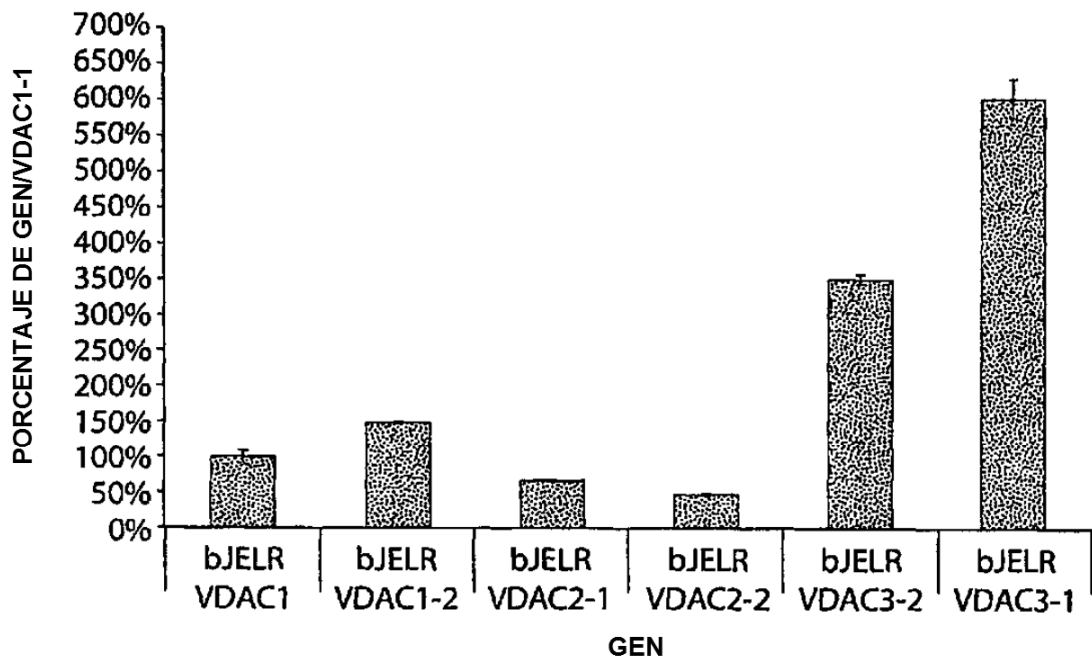


Fig. 13

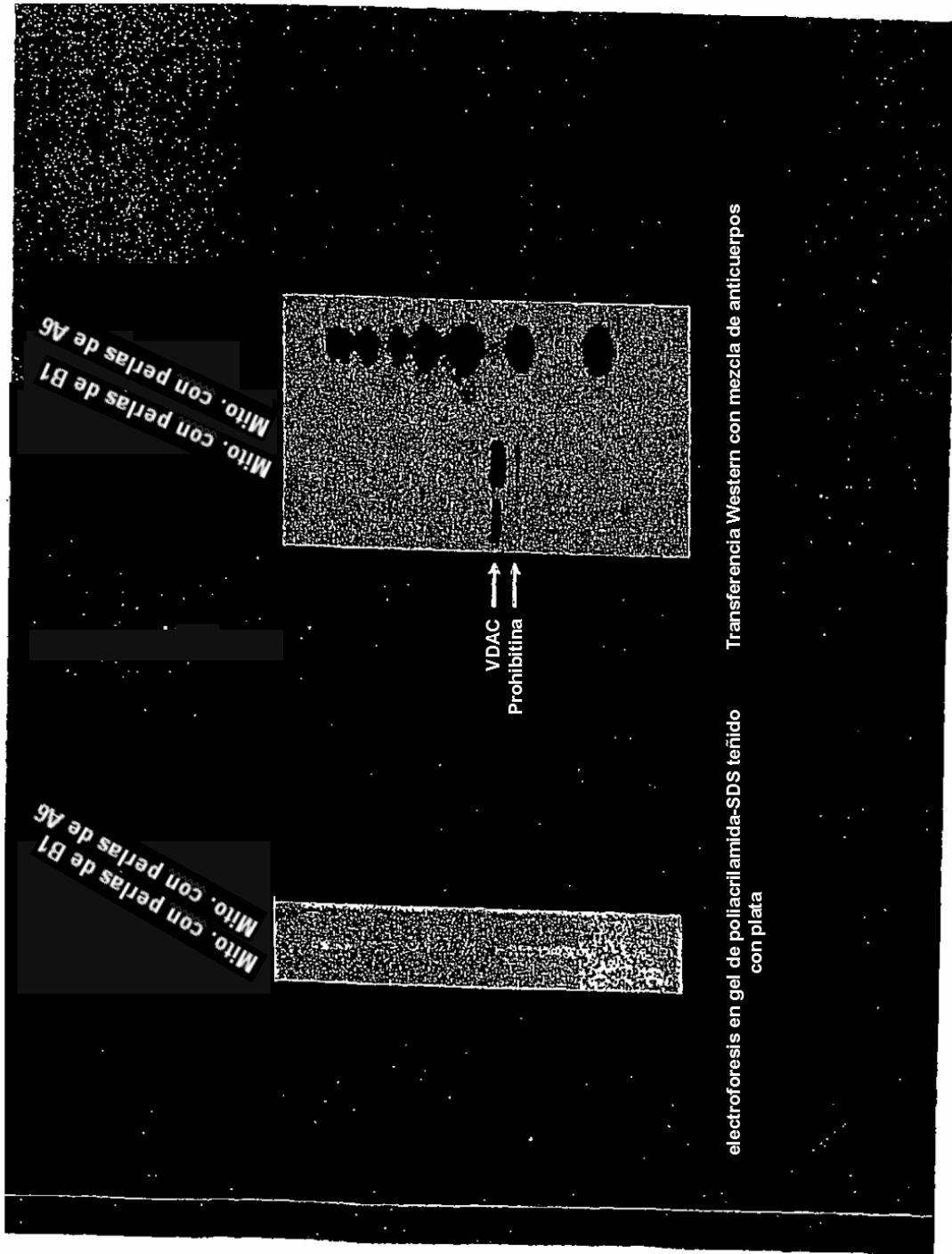


Fig. 14

ENSAYO DE MCL – LECTURA DE CÉLULAS TOTALES HCT116

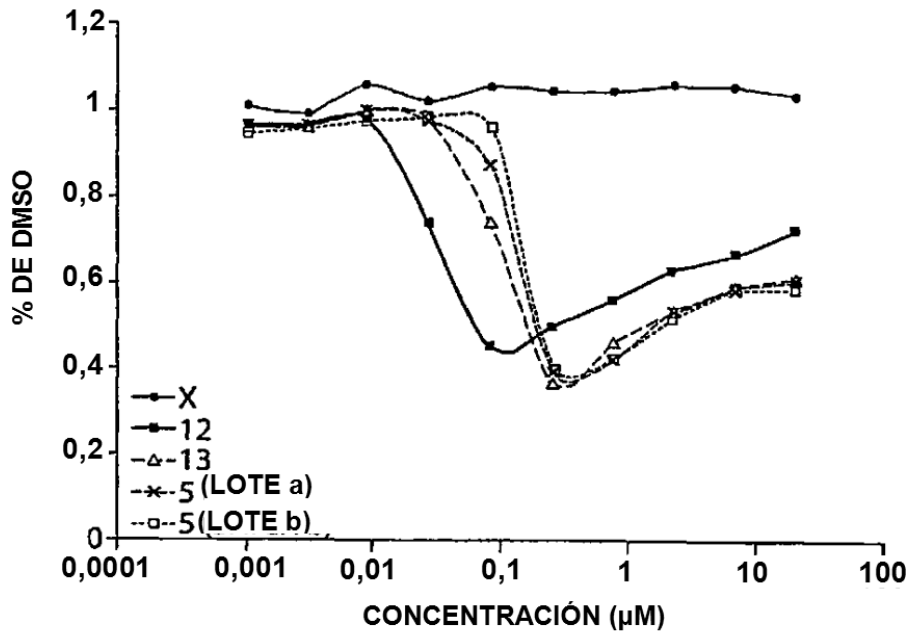


Fig. 15A

ENSAYO DE MCL – LECTURA DE CÉLULAS TOTALES DLD-1

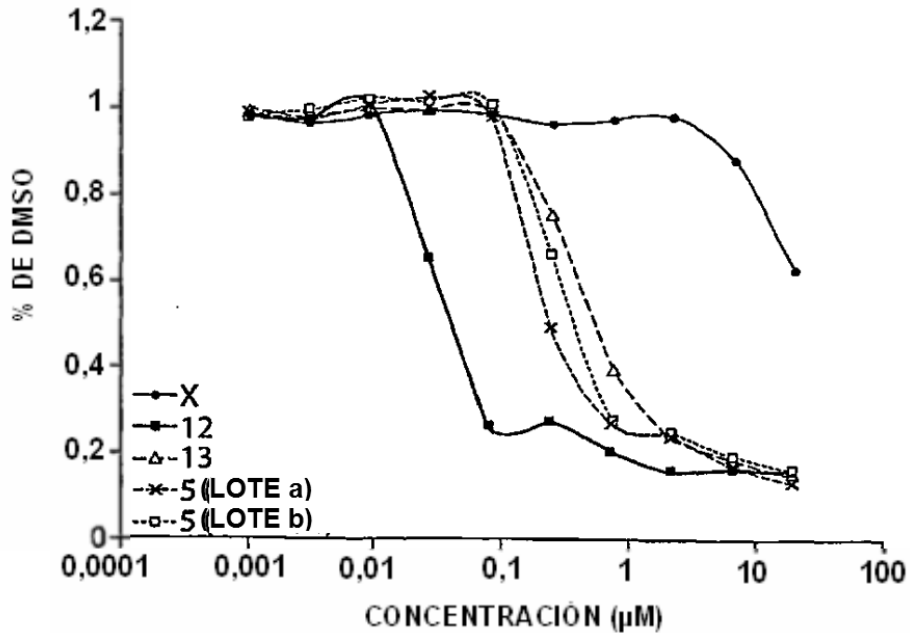


Fig. 15B



ENSAYO DE MCL – LECTURA DE CÉLULAS TOTALES OVCAR-3

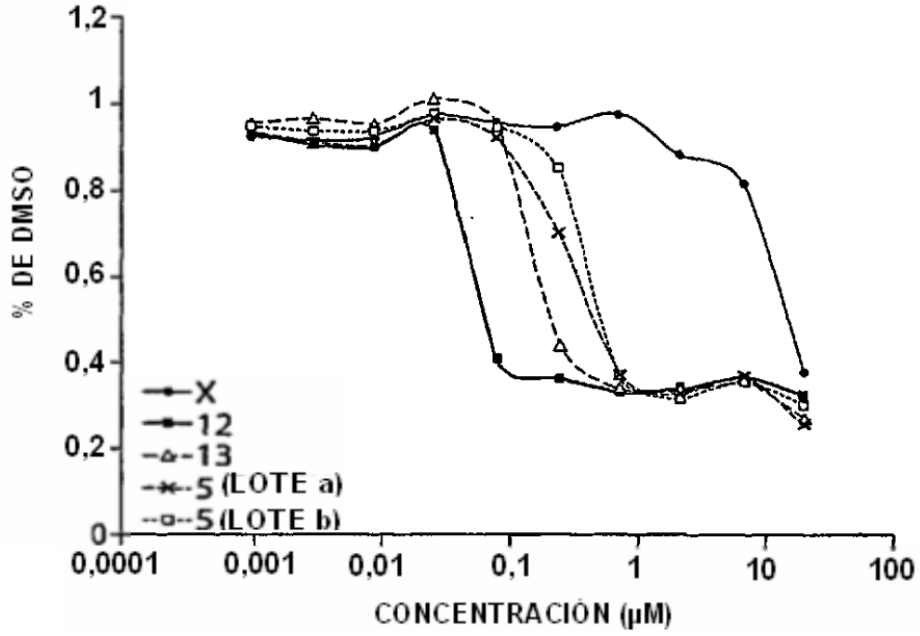


Fig. 15C

ENSAYO DE MCL – LECTURA DE CÉLULAS TOTALES BT549

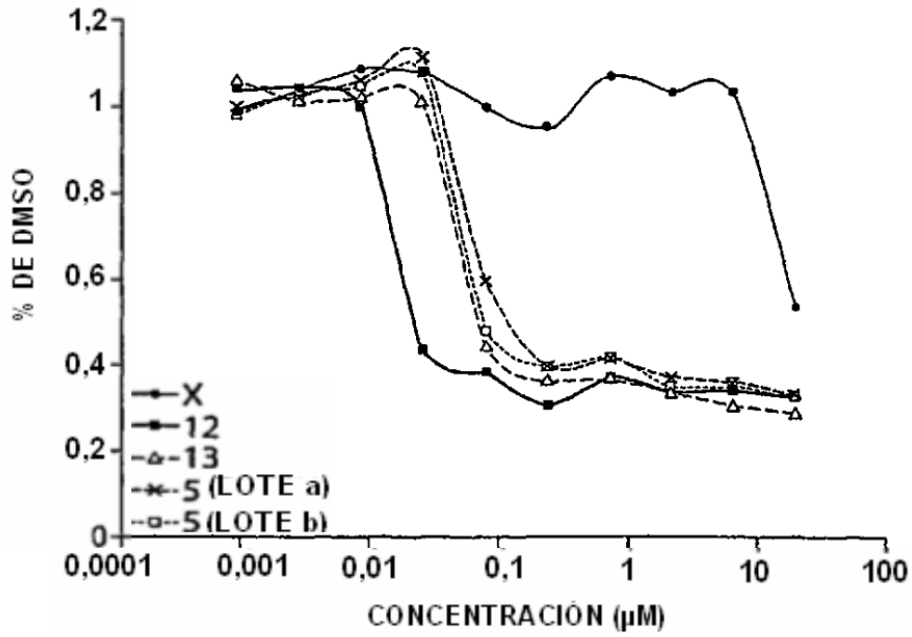


Fig. 15D

ENSAYO DE MCL – LECTURA DE CÉLULAS TOTALES MiaPaca2

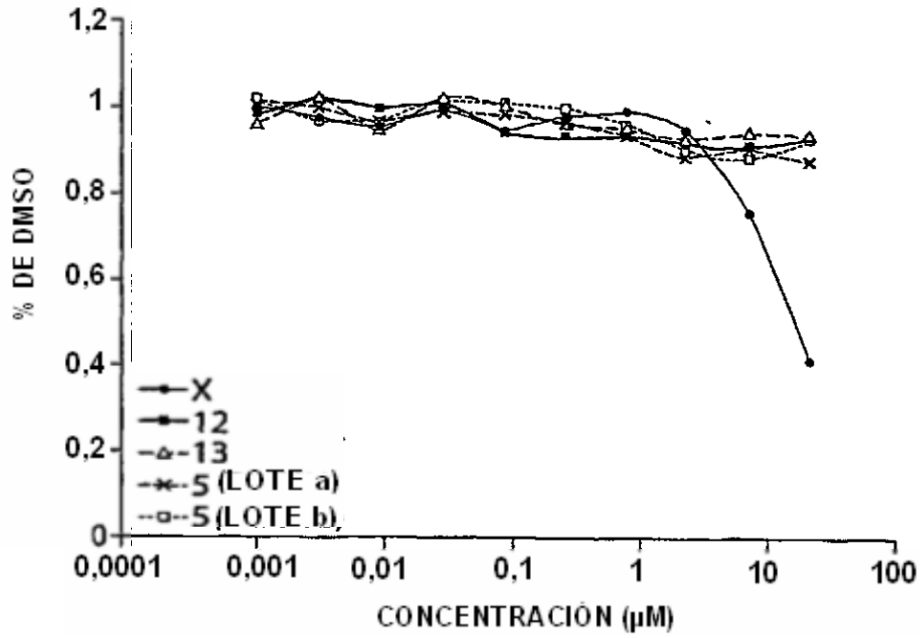


Fig. 16A

ENSAYO DE MCL – LECTURA DE CÉLULAS TOTALES DU145

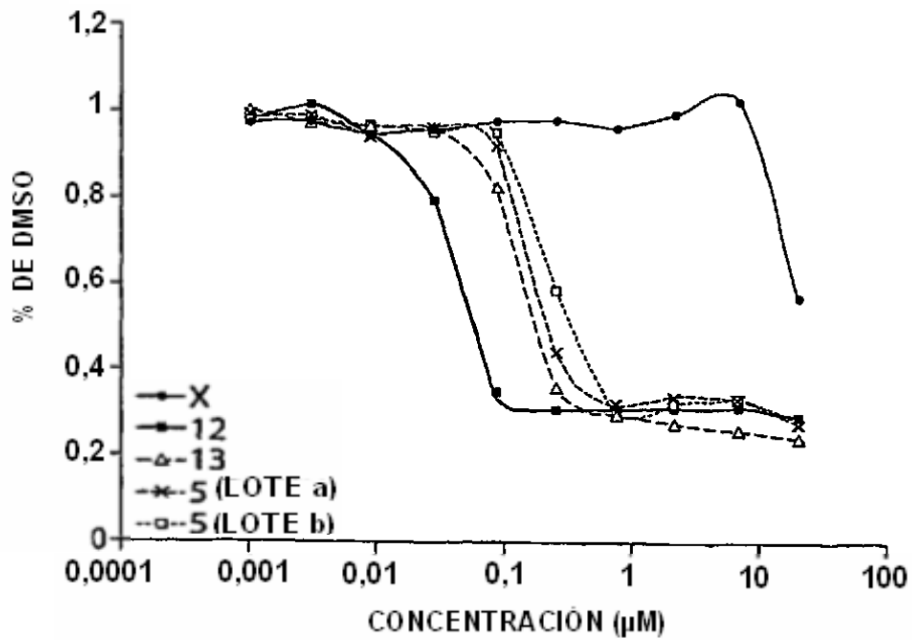


Fig. 16B

ENSAYO DE MCL – LECTURA DE CÉLULAS TOTALES SK-Mel 28

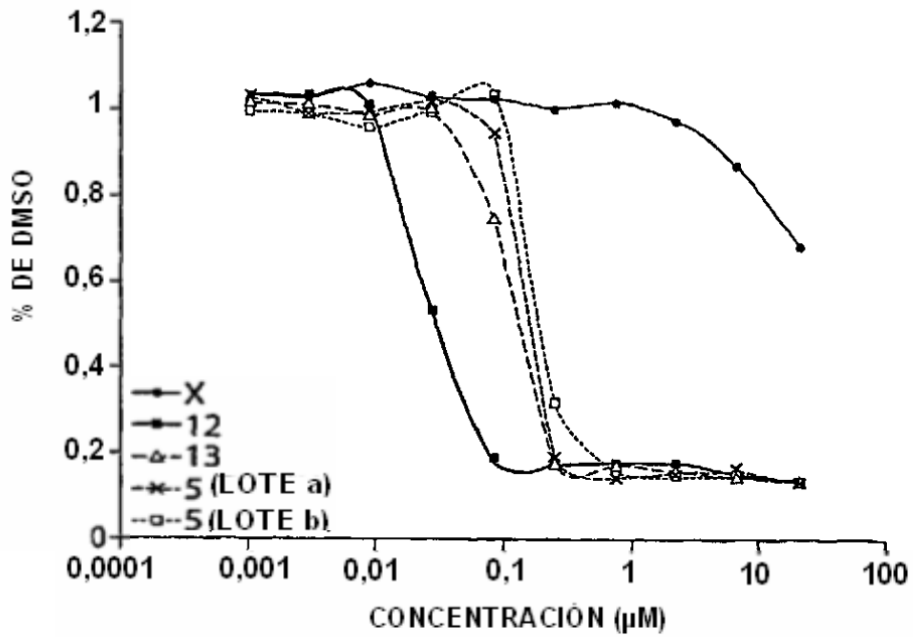


Fig. 16C

ENSAYO DE MCL – LECTURA DE CÉLULAS TOTALES Malm3M

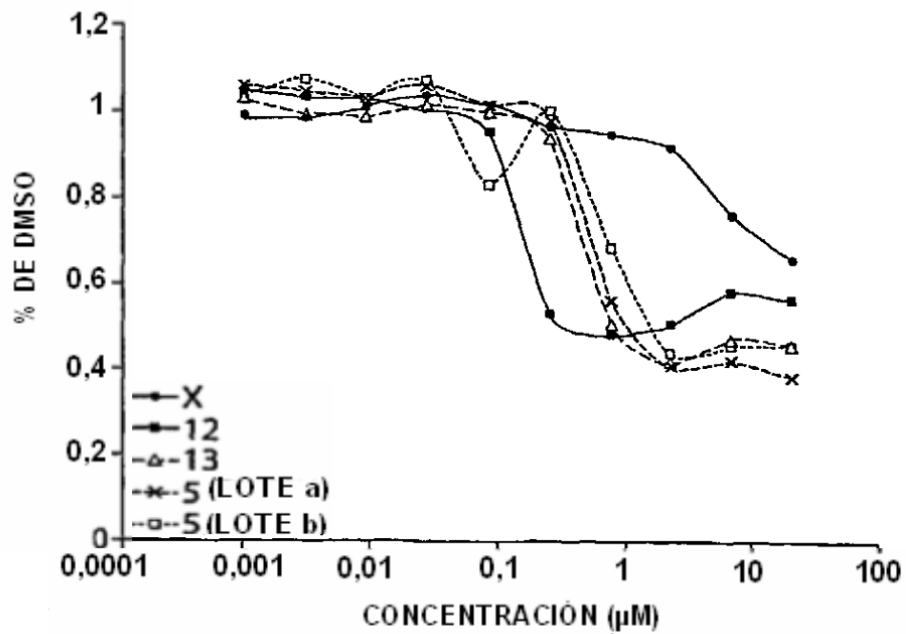


Fig. 16D

ENSAYO DE MCL – LECTURA DE CÉLULAS TOTALES BT549

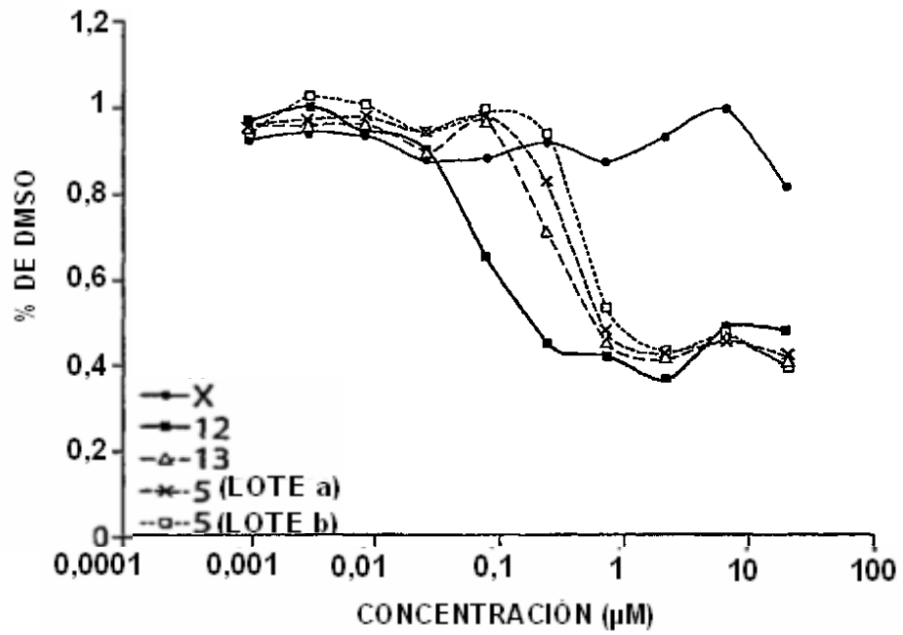


Fig. 17A

ENSAYO DE MCL – LECTURA DE CÉLULAS TOTALES MCF-7

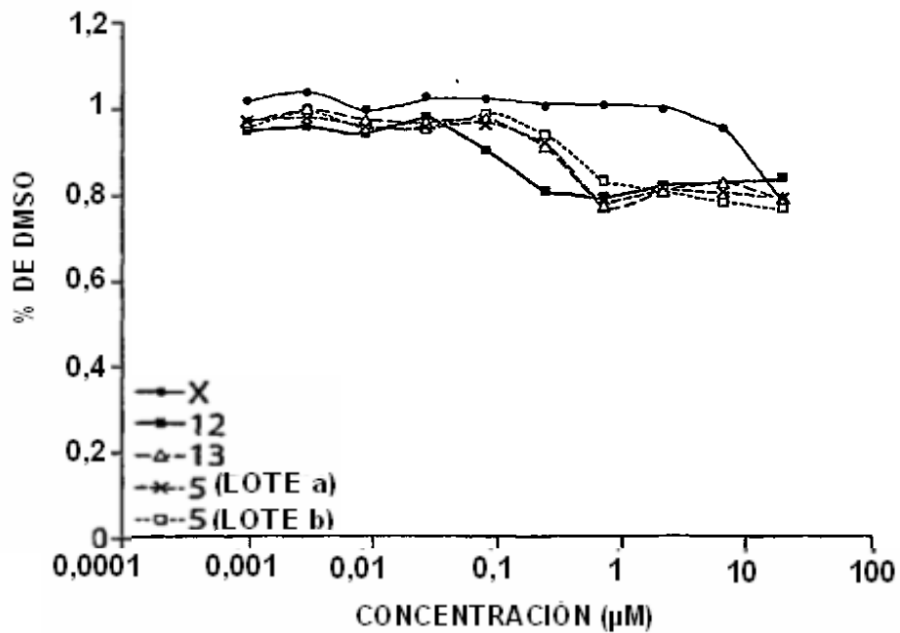


Fig. 17B

ENSAYO DE MCL – LECTURA DE CÉLULAS TOTALES HOP-92

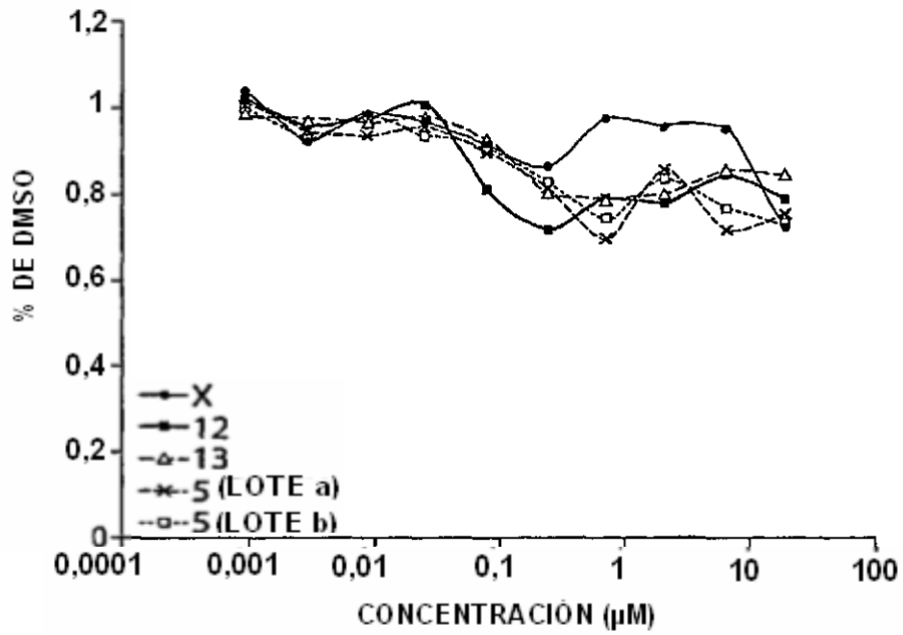


Fig. 17C

ENSAYO DE MCL – LECTURA DE CÉLULAS TOTALES HOP-62

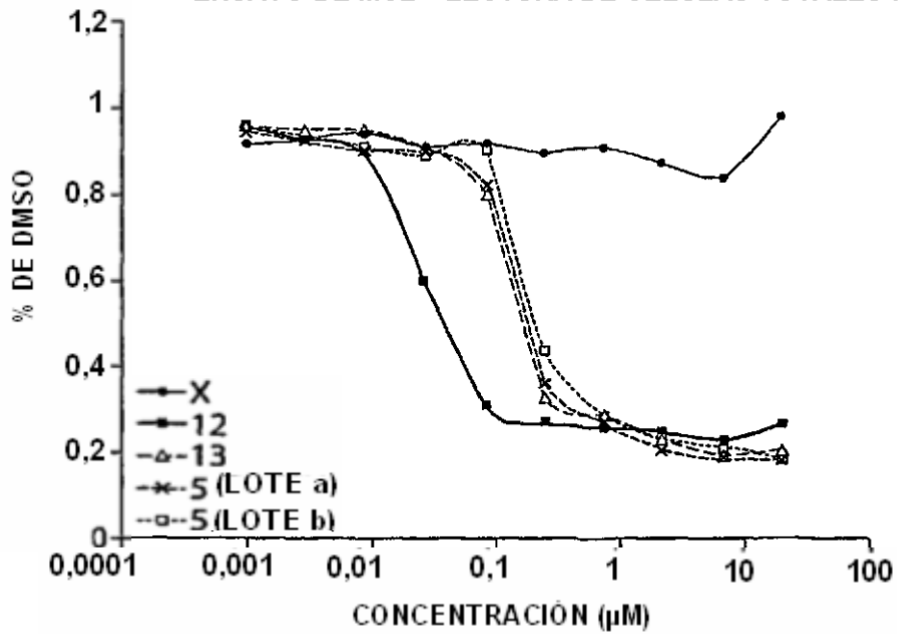


Fig. 17D

EL COMPUESTO 6 INDUCE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL EN XENOINJERTOS HT-1080

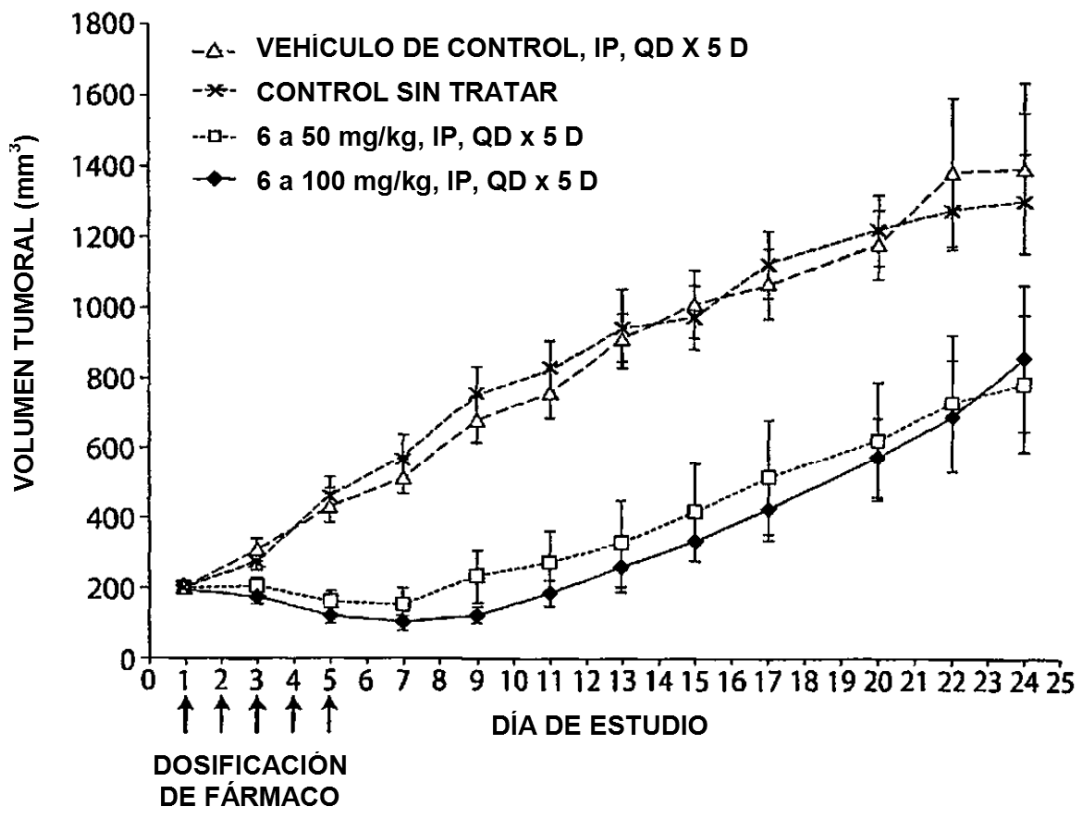


Fig. 18

EL COMPUESTO 5 INDUCE UNA REGRESIÓN TUMORAL SÓLIDA EN UN MODELO DE XENOINJERTO HT-1080

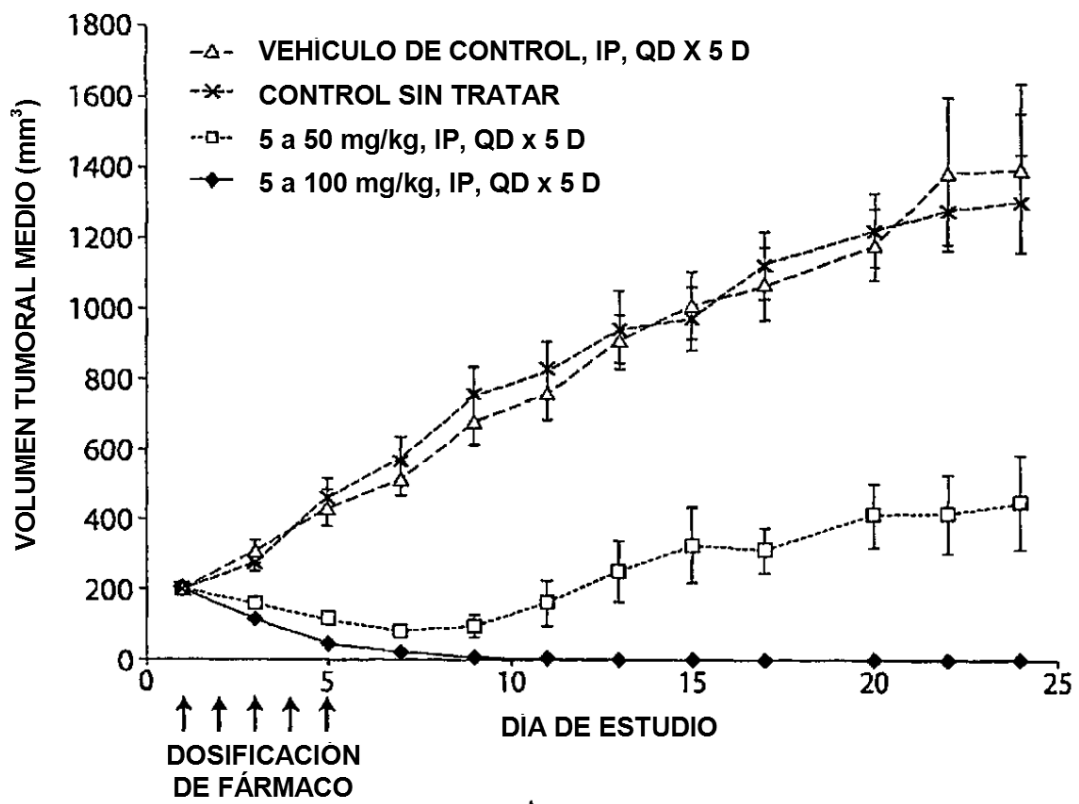


Fig. 19

TENDENCIAS DEL PESO CORPORAL PARA 5 EN XENOINJERTO  
HT-1080

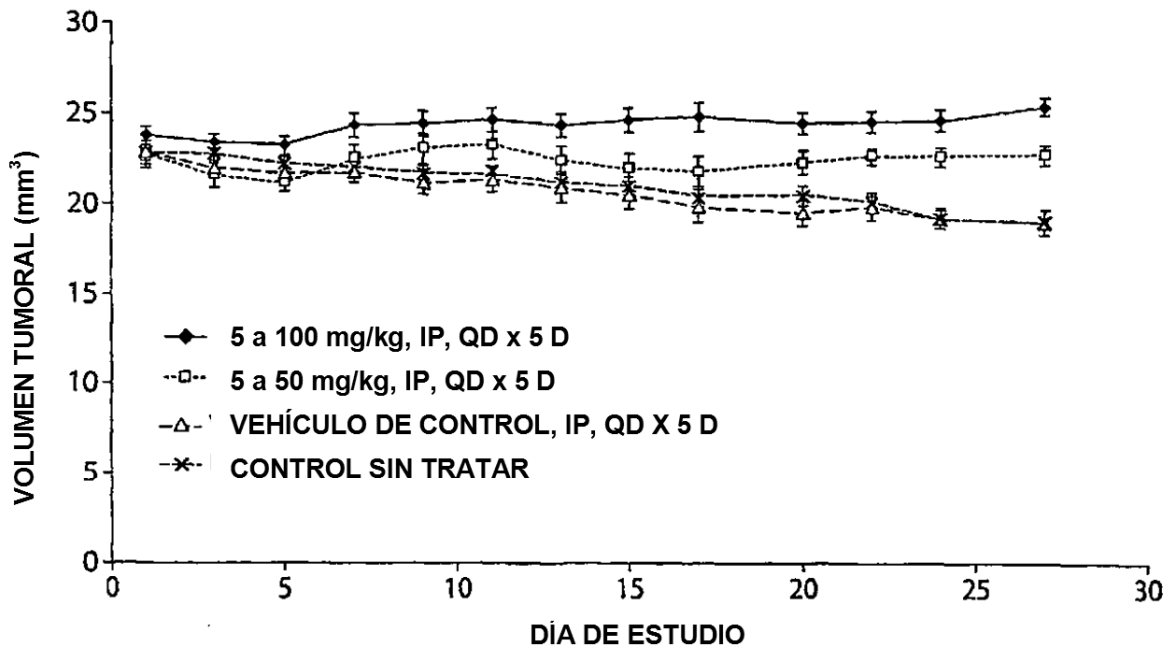


Fig. 20



EL COMPUESTO 6 INDUCE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL EN XENOINJERTOS PANC1

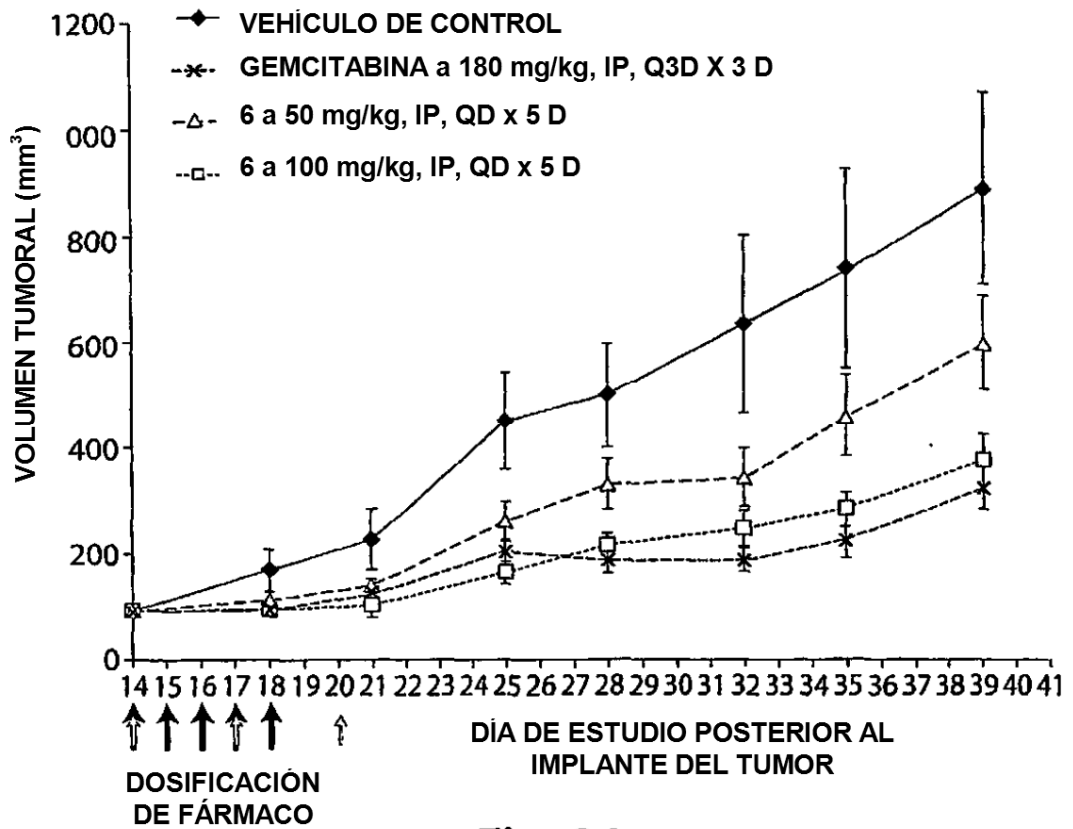


Fig. 21

EL COMPUESTO 5 INDUCE LA REGRESIÓN TUMORAL EN UN MODELO DE XENOINJERTO PANC-1

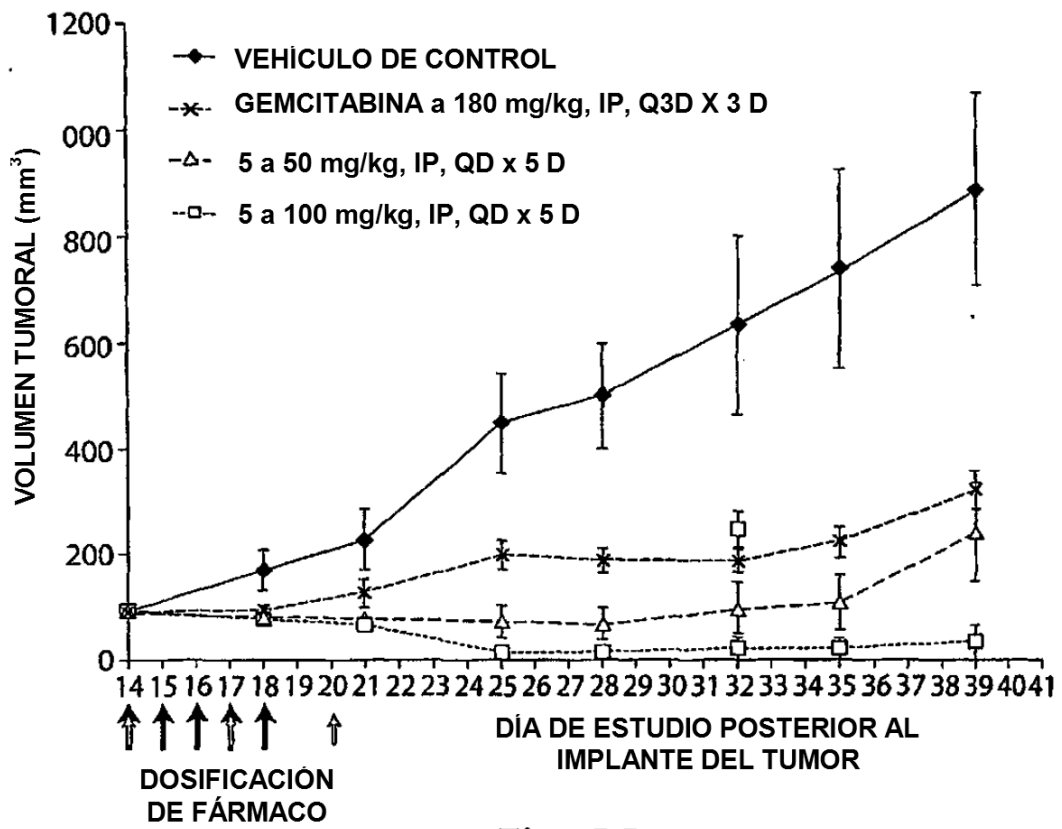


Fig. 22

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

5

**Documentos de patente citados en la descripción**

- US 20040248221 A [0003]
- WO 04078940 A2 [0109]
- EP 1439227 A1 [0109]
- WO 04048545 A2 [0109]
- US 20040029275 A1 [0109]
- WO 03076592 A2 [0109]
- WO 04076674 A1 [0109]
- WO 9746671 A1 [0109]
- US 4868116 A [0240]
- US 4980286 A [0240]
- WO 8907136 A [0240]
- WO 8902468 A [0240]
- WO 8905345 A [0240]
- WO 9207573 A [0240]
- WO 9325234 A [0241]
- WO 9406920 A [0241]
- WO 9411524 A [0241]
- WO 9106309 A [0246]
- JP 1047381 A [0246]
- EP 43075 A [0246]
- WO 9304701 A [0247]
- WO 9222635 A [0247]
- WO 9220316 A [0247]
- WO 9219749 A [0247]
- WO 9206180 A [0247]
- US 5166320 A [0247]
- US 5328470 A [0248]
- US 5821072 A [0280]

**10 Literatura no patente citada en la descripción**

- MILLER ; OJIMA. *Chem. Rec.*, 2002, vol. 1, 195-211 [0001]
- WEINSTEIN et al. *Science*, 1997, vol. 275, 343-349 [0001]
- SHAWVER et al. *Cancer Cell*, 2002, vol. 1 (1), 17-23 [0002]
- CAPDEVILLE et al. *Nat Rev Drug Disco*, 2002, vol. 1, 493-502 [0002]
- MOKBEL ; HASSANALLY. *Curr Med Res Opin*, 2001, vol. 17, 51-9 [0002]
- SHI et al. *Cancer Res*, 2002, vol. 62, 5027-34 [0003]
- DRUKER et al. *Nat Med*, 1996, vol. 2, 561-6 [0003]
- STOCKWELL et al. *Chem Biol*, 1999, vol. 6, 71-83 [0003] [0130]
- TORRANCE et al. *Nat Biotechnol*, 2001, vol. 19, 940-5 [0003] [0130]
- S. DOLMA et al. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell*, 2003, vol. 3, 285-296 [0003]
- HAHN et al. *Nat Med*, 1999, vol. 5, 1164-70 [0087] [0089]
- HAHN et al. *Nat Rev Cancer*, 2002, vol. 2, 331-41 [0087] [0089]
- LESSNICK et al. *Cancer Cell*, 2002, vol. 1, 393-401 [0087] [0089] [0121] [0123]
- SCHREIBER. *Bioorg. Med. Chem.*, 1998, vol. 6, 1127-1152 [0088]
- STOCKWELL. *Nat Rev Genet*, 2000, vol. 1, 116-25 [0088]
- STOCKWELL. *Trends Biotechnol*, 2000, vol. 18, 449-55 [0088]
- BROWN et al. *Nature*, 1994, vol. 369, 756-758 [0088]
- SABATINI et al. *Cell*, 1994, vol. 78, 35-43 [0088]
- Bos. *Cancer Res.*, 1989, vol. 49, 4682-4689 [0095]
- HILLEMANN. *Dev Biol Stand*, 1998, vol. 94, 183-190 [0096]
- HAHN et al. *Mol Cell Biol*, 2002, vol. 22, 2111-23 [0121]
- HAHN et al. *Nature*, 1999, vol. 400, 464-8 [0121]
- HAHN ; WEINBERG. *Nat Rev Cancer*, 2002, vol. 2, 331-41 [0121] [0132]
- SIMONS et al. *Genome Res*, 2001, vol. 11, 266-73 [0130]
- SELLERS ; KAELIN. *J Clin Oncol*, 1997, vol. 15, 3301-12 [0132]
- SHERR. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, vol. 2, 731-7 [0132]
- HARLEY. *Pathol Biol (Paris)*, 1994, vol. 42, 342-5 [0132]
- WANG et al. *Science*, 1998, vol. 282, 284-7 [0134]
- CALIN et al. *Oncogene*, 2000, vol. 19, 1191-5 [0134]
- KOHNO et al. *Cancer Res*, 1999, vol. 59, 4170-4 [0134]
- RUEDIGER et al. *Oncogene*, 2001, vol. 20, 1892-9 [0134]
- RUEDIGER et al. *Oncogene*, 2001, vol. 20, 10-5 [0134]
- HAMAD et al. *Genes Dev*, 2002, vol. 16, 2045-57 [0138]

- **MILLWARD et al.** *Trends Biochem Sci*, 1999, vol. 24, 186-91 [0138]
- **JAKOBY WB et al.** *Methods in Enzymology*, 1974, vol. 46, 1 [0225]
- **KING RW.** *Science*, 1997, vol. 277, 973 [0226]
- **KIEFFER.** *PNAS*, 1992, vol. 89, 12048 [0226]
- **HAUSHALTER KA.** *Curr. Biol.*, 1999, vol. 9, 174 [0226]
- **TANAKA et al.** *Mol. Pharmacol.*, 1999, vol. 55, 356 [0226]
- **SMITH GP.** *Science*, 1985, vol. 228, 1315 [0227]
- **PARMLEY SF et al.** *Gene*, 1988, vol. 73, 305 [0227]
- **SHOSHAN-BARMATZ et al.** *Cell Biochem Biophys*, 2003, vol. 39, 279-92 [0231]
- **HINSCH et al.** *J Biol Chem.*, 2004, vol. 279, 15281-8 [0231]
- **FUSARO et al.** *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, 47853-47861 [0232]
- **FUSARO et al.** *Oncogene*, 2002, vol. 21, 4539-4548 [0232]
- **FU et al.** *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 3984-3990 [0233]
- **CRIMAUDO et al.** *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 75-82 [0233]
- **HIGY et al.** *Biochemistry*, 2004, vol. 43, 12716-22 [0234]
- **PARLATI et al.** *Nature*, 2000, vol. 407, 194-198 [0235]
- **MAO et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 95, 8175-8180 [0235]
- **HUMEAU et al.** *Mol Ther.*, 2004, vol. 9 (6), 902-13 [0240]
- **CURRAN et al.** *Mol Ther.*, 2000, vol. 1 (1), 31-8 [0240]
- **ENGEL ; KOHN.** *Front Biosci.*, 1990, vol. 4, e26-33 [0240]
- **MILLER, A.D.** *Blood*, 1990, vol. 76, 271 [0240]
- **Current Protocols in Molecular Biology.** John Wiley & Sons, Inc., Greene Publishing Associates, 2001 [0240]
- **EGLITIS et al.** *Science*, 1985, vol. 230, 1395-1398 [0240]
- **DANOS ; MULLIGAN.** *PNAS USA*, 1988, vol. 85, 6460-6464 [0240]
- **WILSON et al.** *PNAS USA*, 1988, vol. 85, 3014-3018 [0240]
- **ARMENTANO et al.** *PNAS USA*, 1990, vol. 87, 6141-6145 [0240]
- **HUBER et al.** *PNAS USA*, 1991, vol. 88, 8039-8043 [0240]
- **FERRY et al.** *PNAS USA*, 1991, vol. 88, 8377-8381 [0240]
- **CHOWDHURY et al.** *Science*, 1991, vol. 254, 1802-1805 [0240]
- **VAN BEUSECHEM et al.** *PNAS USA*, 1992, vol. 89, 7640-7644 [0240]
- **KAY et al.** *Human Gene Therapy*, 1992, vol. 3, 641-647 [0240]
- **DAI et al.** *PNAS USA*, 1992, vol. 89, 10892-10895 [0240]
- **HWU et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 150, 4104-4115 [0240]
- **ROUX et al.** *PNAS USA*, 1989, vol. 86, 9079-9083 [0241]
- **JULAN et al.** *J. Gen Virol*, 1992, vol. 73, 3251-3255 [0241]
- **GOUD et al.** *Virology*, 1983, vol. 163, 251-254 [0241]
- **NEDA et al.** *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 14143-14146 [0241]
- **BERKNER et al.** *BioTechniques*, 1988, vol. 6, 616 [0242]
- **ROSENFELD et al.** *Science*, 1991, vol. 252, 431-434 [0242]
- **ROSENFELD et al.** *Cell*, 1992, vol. 68, 143-155 [0242]
- **LEMARCHAND et al.** *PNAS USA*, 1992, vol. 89, 6482-6486 [0242]
- **HERZ ; GERARD.** *PNAS USA*, 1993, vol. 90, 2812-2816 [0242]
- **QUANTIN et al.** *PNAS USA*, 1992, vol. 89, 2581-2584 [0242]
- **HAJ-AHMAND ; GRAHAM J.** *Virology*, 1986, vol. 57, 267 [0242]
- **JONES et al.** *Cell*, 1979, vol. 16, 683 [0242]
- **GRAHAM et al.** *Methods in Molecular Biology. Humana*, 1991, vol. 7, 109-127 [0242]
- **MUZYCZKA et al.** *Curr. Topics in Micro. Immunol.*, 1992, vol. 158, 97-129 [0243]
- **FLOTTE et al.** *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1992, vol. 7, 349-356 [0243]
- **SAMULSKI et al.** *J. Virology*, 1989, vol. 63, 3822-3828 [0243]
- **MCLAUGHLIN et al.** *J. Virology*, 1989, vol. 62, 1963-1973 [0243]
- **TRATSCHIN et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 3251-3260 [0243]
- **HERMONAT et al.** *PNAS USA*, 1984, vol. 81, 6466-6470 [0243]
- **TRATSCHIN et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 4, 2072-2081 [0243]
- **WONDISFORD et al.** *Mol. Endocrinol.*, 1988, vol. 2, 32-39 [0243]
- **TRATSCHIN et al.** *J. Virology*, 1994, vol. 51, 611-619 [0243]
- **FLOTTE et al.** *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 3781-3790 [0243]
- **PEPOSE et al.** *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, vol. 35, 2662-2666 [0244]
- **MIZUNO et al.** *No Shinkei Geka*, 1992, vol. 20, 547-551 [0246]
- **MIZUNO et al.** *Neurol. Med. Chir.*, 1992, vol. 32, 873-876 [0246]
- **MULLIGAN et al.** *Science*, 1993, 260-926 [0247]
- **WAGNER et al.** *PNAS USA*, 1992, vol. 89, 7934 [0247]

- CHRISTIANO et al. *PNAS USA*, 1993, vol. 90, 2122 [0247]
- CHEN et al. *PNAS USA*, 1994, vol. 91, 3054-3057 [0248]
- ROTHBARD et al. *Nat Med.*, 2000, vol. 6(11), 1253-7 [0249]
- ROTHBARD et al. *J Med Chem.*, 2002, vol. 45 (17), 3612-8 [0249]
- DEROSSI et al. *J Biol Chem*, 1994, vol. 269, 10444-10450 [0251]
- PEREZ et al. *J Cell Sci*, 1992, vol. 102, 717-722 [0251]
- DEROSSI et al. *J Biol Chem*, 1996, vol. 271, 18188-18193 [0251]
- KUPPUSWAMY et al. *Nucl. Acids Res.*, 1989, vol. 17, 3551-3561 [0253]
- FRANKEL ; PABO. *Cell*, 1989, vol. 55, 1189-1193 [0253]
- GREEN ; LOEWENSTEIN. *Cell*, 1989, vol. 55, 1179-1188 [0253]
- RUBEN et al. *J. Virol.*, 1989, vol. 63, 1-8 [0253]
- T. HIGASHIJIMA et al. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 14176 [0254]
- SUBBARAO et al. *Biochemistry*, 1987, vol. 26, 2964 [0258]
- EUBANKS et al. *Peptides. Chemistry and Biology. ESCOM*, 1988, 566-69 [0263]
- C. HIRSCHBERG et al. *Ann. Rev. Biochem.*, 1987, vol. 56, 63-87 [0265]
- E. RUOSLAHTI. *Ann. Rev. Biochem.*, 1988, vol. 57, 375-413 [0266]
- HART S L et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 12468-12474 [0269]
- ELLIOTT G. ; O'HARE P. *Cell*, 1997, vol. 88, 223-233 [0269]
- ISSELBACHER et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 1814-1877 [0271]
- ISSELBACHER et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 1996, 1814-1882 [0279]
- LOWE et al. *Cell*, 1993, vol. 74 (95), 7-697 [0280]
- ISSELBACHER et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 1814-1882 [0286]
- WANG et al. *Hum. Immunol.*, 1993, vol. 37, 264-270 [0289]
- TESTA ; GIORDANO. *Semin Cancer Biol*, 2001, vol. 11, 31-8 [0292]
- BOSCH et al. *J Clin Pathol*, 2002, vol. 55, 244-65 [0292]
- ELENBAAS et al. *Genes Dev*, 2001, vol. 15, 50-65 [0292]
- JORCYK et al. *Prostate*, 1998, vol. 34, 10-22 [0292]
- PEREZ-STABLE et al. *Cancer Res*, 1997, vol. 57, 900-6 [0292]
- RICH et al. *Cancer Res*, 2001, vol. 61, 3556-60 [0292]
- SANDMOLLER et al. *Cell Growth Differ*, 1995, vol. 6, 97-103 [0292]
- VAN DYKE ; DERVAN. *Science*, 1984, vol. 225, 1122-7 [0294]
- WARING ; WAKELIN. *Nature*, 1974, vol. 252, 653-7 [0294]
- ZALACAIN et al. *FEBS Lett*, 1982, vol. 148, 95-7 [0294]
- RAO. *J Med Chem*, 1968, vol. 11, 939-41 [0294]
- LOOMIS ; BELL. *J Biol Chem*, 1988, vol. 263, 1682-92 [0294]
- LAURENT ; JAFFREZOU. *Blood*, 2001, vol. 98, 913-24 [0295]
- MULLER et al. *Int J Mol Med*, 1998, vol. 1, 491-4 [0295]
- RICHARD et al. *Leuk Res*, 2002, vol. 26, 927-31 [0295]
- ANDOH et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, vol. 84, 5565-9 [0297]
- BJORNSTI et al. *Cancer Res*, 1989, vol. 49, 6318-23 [0297]
- CHAMPOUX. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, vol. 922, 56-64 [0297]
- D'ARPA et al. *Cancer Res*, 1990, vol. 50, 6919-24 [0297]
- ENG et al. *Mol Pharmacol*, 1988, vol. 34, 755-60 [0297]
- HSIANG et al. *Cancer Res*, 1989, vol. 49, 5077-82 [0297]
- HSIANG ; LIU. *Cancer Res*, 1988, vol. 48, 1722-6 [0297]
- LIU et al. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, vol. 922, 1-10 [0297]
- MADDEN ; CHAMPOUX. *Cancer Res*, 1992, vol. 52, 525-32 [0297]
- TSAO et al. *Cancer Res*, 1993, vol. 53, 5908-14 [0297]
- TRAGANOS et al. *Ann N Y Acad Sci*, 1996, vol. 803, 101-10 [0300]
- MAJNO ; JORIS. *Am J Pathol*, 1995, vol. 146, 3-15 [0300]
- CHAN et al. *Neuroreport*, 2001, vol. 12, 541-545 [0300]
- AHMED et al. *J. Immunol. Methods*, 1994, vol. 170, 211-224 [0301]
- NOCIARI et al. *J. Immunol. Methods*, 1998, vol. 13, 157-167 [0309]