

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 597**

51 Int. Cl.:

C07D 471/14 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2006 E 06756007 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 1915374**

54 Título: **Derivados de 2-indolil imidazo[4,5-d]fenantrolina y su uso en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

25.05.2005 US 684162 P

22.08.2005 US 710551 P

31.03.2006 US 787526 P

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

07.07.2014

73 Titular/es:

**LORUS THERAPEUTICS INC. (100.0%)
2 MERIDIAN ROAD
TORONTO, ONTARIO M9W 4Z7, CA**

72 Inventor/es:

**HUESCA, MARIO;
YOUNG, AIPING, H.;
LEE, YOON;
KHINE, AYE AYE;
WRIGHT, JIM, A.;
LOCK, LISA y
AL-QAWASMEH, RAED.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 473 597 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 2-indolil imidazo[4,5-d]fenantrolina y su uso en el tratamiento del cáncer

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las terapias del cáncer y, en particular, al uso de derivados de 2-indolil imidazo[4,5-d]fenantrolina en el tratamiento del cáncer.

10 Antecedentes de la invención

Se han desarrollado quelantes de metales para el tratamiento de enfermedades causadas por sobrecarga de metales. Más recientemente, sin embargo, los compuestos capaces de quelar hierro se están estudiando como potenciales terapias anticancerosas, ya que el hierro tiene un papel importante en los sitios activos de una amplia gama de proteínas implicadas en el metabolismo energético, la respiración y la síntesis de ADN. Una de estas proteínas, la ribonucleótido reductasa (RR), es una proteína que contiene hierro que es esencial para la conversión de ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos para la síntesis de ADN y, por lo tanto, un objetivo para las terapias contra el cáncer. Muchos quelantes de hierro son potentes inhibidores de la RR debido a su capacidad para unirse a hierro (Richardson, D. R. (2002) *Crit Rev Oncol Hematol* 42(3): 267-81.). Por ejemplo, el quelante de hierro deferoxamina (DFO), que se ha aprobado clínicamente para el tratamiento de enfermedades de sobrecarga de hierro, incluyendo la β -talasemia (Buss, J. L., B. T. Greene, J. Turner, F. M. Torti and S. V. Torti (2004) *Curr Top Med Chem* 4(15): 1623-35), también se ha demostrado que es un inhibidor de la RR. Además, se ha demostrado que algunos tumores agresivos son sensibles a la quelación del hierro por la DFO. Sin embargo, el uso de la DFO sin embargo, es costoso, requiere una prolongación de la administración subcutánea y el compuesto presenta una semivida corta. Además de la DFO, otros quelantes del hierro con actividad antiproliferativa se encuentran en desarrollo, incluyendo Triapina (actualmente en fase II), 311, tachpiridina, y O-Trensox (Richardson, ant.). No obstante, la triapine puede tener una utilidad limitada como terapia contra el cáncer, ya que presenta una baja solubilidad en agua.

La patente de EE.UU. 6.589.966 describe una nueva familia de quelantes de metales caracterizados como compuestos químicos hexadentados, que se unen al hierro y que tienen actividad antiproliferativa contra las células tumorales. Además, la solicitud de patente de EE.UU. 2002/0119955 describe compuestos adicionales basadas en 3-AP (estructuralmente relacionado con Triapina) que pueden exhibir una utilidad terapéutica adecuada en el tratamiento de neoplasias, incluyendo el cáncer.

La quelación de cinc también puede ser un importante, pero relativamente inexplorado, determinante de los efectos biológicos de los quelantes de hierro. Por ejemplo, el quelante del hierro tacpiridina, que se encuentra en investigación preclínica como potencial agente contra el cáncer, quela el cinc además del hierro, y esto puede desempeñar un papel en su citotoxicidad (Zhao, R., et al. (2004) *Biochem Pharmacol* 67(9): 1677-88.). El cinc tiene funciones catalíticas y estructurales en cientos de enzimas dependientes de cinc y motivos en dedo de cinc de proteínas implicadas en la interacción ADN-proteína o proteína-proteína. En consecuencia, la deficiencia, así como la sobrecarga de cinc, causan una amplia variedad de alteraciones en el metabolismo de los mamíferos. Depletion of zinc *in vitro* has been shown to cause apoptosis (McCabe, M. J., Jr., S. A. Jiang and S. Orrenius (1993) *Lab Invest* 69(1): 101-10), para disminuir significativamente la proliferación celular de las células de carcinoma de colon HT-29 (Kindermann, B., F. Doring, M. Pfaffl y H. Daniel (2004) *J Nutr* 134(1): 57-62), y para alterar la progresión del ciclo celular (Chen, X., et al. X., et al. (2001) *J Biol Chem* 276(32): 30423-8.).

Como alternativa, otros quelantes de metales pueden ejercer efectos antineoplásicos a través de la formación de complejos de quelato citotóxicos. Esto ocurre predominantemente con los metales activos en redox, hierro y cobre. Por ejemplo, las bleomicinas son una familia de antibióticos glucopeptídicos con actividad antitumoral. Se utilizan clínicamente en la quimioterapia de combinación contra linfomas, carcinomas de células escamosas y tumores de células germinales. Contienen un dominio de unión a ADN y un dominio de unión a metal, que se une a Fe (II) o Cu (I). La presencia de oxígeno y un reductor conduce a la escisión del ADN a través de la formación de radicales intermedios (Chen, J. and J. Stubbe (2005) *Nat Rev Cancer* 5(2): 102-12). La triapina quelante del hierro, que inhibe la RR a través de la quelación del hierro, también puede dañar la RR y otras moléculas vitales mediante la generación de radicales libres tras la formación del complejo de hierro (Chaston, T. B., et al. (2003) *Clin Cancer Res* 9(1): 402-14). El uso de conjugados de bleomicina dirigiendo un compuesto a un tumor del cuerpo se describe en la patente de EE.UU. N° 4.758.421.

La citotoxicidad del quelante de metales, 10-fenantrolina (OP) se ha atribuido a su capacidad para funcionar tanto como quelante como de tipo quelato. Como un quelante, se ha demostrado que combina con cinc o hierro y, por lo tanto, inhibe las enzimas que requieren cinc o hierro para su actividad. Como alternativa, se ha informado que los complejos de quelatos de 1,10-fenantrolina con iones metálicos divalentes son citotóxicos (Shulman, A. y G. A. Laycock (1977) *Chem Biol Interact* 16(1): 89-99.) y el quelato de cobre estimula la degradación del ADN (Downey, K. M., B. G. Que y A. G. So (1980). *Biochem Biophys Res Commun* 93(1): 264-70). Los complejos de cobre-OP pueden unirse no covalentemente a la ranura menor del ADN y catalizar la escisión de la cadena sencilla de los ácidos

nucleicos en presencia de peróxido de hidrógeno y un reductor (Sigman., D. S., et al. (1979) J Biol Chem 254(24): 12269-72).

Los complejos de cobre-OP se utilizan frecuentemente como nucleasas químicas y se han generado agentes de escisión de ADN de alta especificidad mediante la unión a las proteínas de unión a ADN específicas desecuencia (Pan, C. Q., R. Landgraf and D. S. Sigman (1994) Mol Microbiol 12(3): 335-42.). OP también se usa ampliamente como inhibidor de metaloproteasas de la matriz (Springman E. B., et al. (1995) Biochemistry 34(48): y se ha demostrado que inhiben la síntesis de los anclajes de glicofosfatidilinositol ((Mann, K. J. and D. Seveler (2001) Biochemistry 40(5): 1205-13) mediante quelación de cinc.

La alteración de la regulación de los genes supresores de tumores se ha implicado en el desarrollo de cáncer, pero el papel exacto de estos genes supresores de tumores en el desarrollo de cáncer todavía no está claro. La familia de genes del factor de tipo Krüppel (KLF) es una familia de factores de transcripción que contienen dedo de cinc conservado evolutivamente que tienen diversos papeles reguladores en el crecimiento, proliferación diferenciación y embriogénesis de las células (Ghaleb, A. M., et al. (2005) Cell Res 15(2): 92-6). Los KLF pueden funcionar como activadores de la transcripción o como represores o como ambos, dependiendo de su interacción con los coactivadores o los correpresores a través de determinados dominios en el extremo amino, los promotores a los que se unen y el contexto celular de su función (Kaczynski, J., T. Cook y R. Urrutia (2003) Genome Biol 4(2): 206). Se piensa que varios miembros de la familia de KLF son supresores tumorales y están implicados en la carcinogénesis. Por ejemplo, se encuentra regulación por disminución de *KLF4* en cáncer de colon (Dang DT, et al. (2000) FEBS Lett, 476: 203-7) and down-regulation of *KLF5* and *KLF10* occurs in breast cancer (Chen C, et al. (2002) Oncogene, 21: 6567-72). Subramaniam M, et al. (1998) J Cell Biochem, 68: 226-36). También se ha sugerido que *KLF6* es un candidato al gen supresor tumoral en la localización cromosómica 10p15 y se observan frecuentes mutaciones en el adenocarcinoma de próstata. Además, también se ha mostrado que *KLF6* transactiva *WAF1*, que codifica un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina del ciclo celular a través de una vía independiente de p53 (Narla G, et al. (2001) Science, 294: 2563-6).

La alteración de a regulación de *KLF4* se ha relacionado con otros cánceres distintos al cáncer de colon tanto *in vitro* and *in vivo*, lo que sugiere que *KLF4* puede tener un efecto supresor tumoral. En el cáncer colorrectal, el nivel de ARNm de *KLF4* se reduce en comparación con tejidos equivalentes normales (Dang et al. (2000), citado anteriormente), y la reexpresión de *KLF4* en una línea celular de cáncer colorrectal tiene como resultado una disminución de la tumorigenicidad (Dang D. T., et al. (2003) Oncogene 22(22): 3424-30). A similar down-regulation and growth suppressive effect of *KLF4* has also been described in bladder cancer (Ohnishi, S., et al. (2003) Biochem Biophys Res Commun 308(2): 251-6.), Gastric cancer (Wei, D., et al. (2005) Cancer Res 65(7): 2746-54.). Cáncer de esófago (Wang, N., et al. (2002). World J Gastroenterol 8(6): 966-70), y leucemia de linfocitos T del adulto (Yasunaga, J., et al. (2004). Cancer Res 64(17): 6002-9). En contraste con el efecto supresor tumoral de *KLF4*, se ha notificado un incremento de la expresión de *KLF4* durante la progresión del cáncer de mama (Foster, K. W., et al. (2000). Cancer Res 60(22): 6488-95.) y carcinoma de células escamosas de la cavidad oral (Foster, K. W., et al (1999). Cell Growth Differ 10(6): 423-34.). Además, Se ha considerado al *KLF4* como marcador de un fenotipo agresivo en el carcinoma de mama ductal infiltrante en estadio temprano (Pandya, A. Y., et al. A. Y., et al. (2004). Clin Cancer Res 10(8): 2709-19.). Por tanto, mientras que el *KLF4* es probable que desempeñe un papel supresor tumoral en los cánceres gastrointestinales y la leucemia, el papel del *KLF4* en el desarrollo de otros tipos de cáncer todavía no está claro.

La expresión de *KLF4* está regulada negativamente por el cinc. Los estudios sobre el efecto de la depleción del cinc sobre la expresión génica en células HT-29 de carcinoma de colon usando matrices de oligonucleótidos humanos mostraron que la expresión del gen de *KLF4* era una de los más reguladas por aumento de entre los 10.000 genes diana analizados. se ha postulado la hipótesis por tanto, de que *KLF4* puede ser un vínculo directo entre el estado del cinc celular y la inhibición del crecimiento (Kindermann, B., F. Doring, M. Pfaffl and H. Daniel (2004). J Nutr 134(1): 57-62.). En un estudio posterior se descubrió que la expresión de *KLF4* aumentaba en células que sobreexpresan el factor de transcripción de metales 1 (MTF-1) (Kindermann, B., F. Doring, J. Budczies and H. Daniel (2005). Biochem Cell Biol 83(2): 221-9.). MTF-1 es un activador de la transcripción sensible a cinc que tiene seis dedos de cinc, que se une a elementos respondedores a metales (MRE) de los genes diana y el promotor de *KLF4* también tiene 3 MRE. Normalmente, MTF-1 está regulado por aumento en las células deficientes en cinc y se ha observado un incremento de la expresión de MTF-1 en las células HT-20 deficientes en cinc (Kindermann et al. 2004, citado anteriormente). Por lo tanto, Por tanto, la respuesta al cinc de *KLF4* en HT-29 está mediada por, al menos en parte, el MTF-1 (Kindermann et al. 2005, citado anteriormente). La expresión de *KLF4* está asociada principalmente con un estado diferenciado terminalmente de las células epiteliales en órganos tales como intestino, piel y timo (Kaczynski et al. piel y timo (Kaczynski et al. 2003, citado anteriormente).

Como se ha descrito en lo que antecede, la 1,10-phenanthroline (OP) es un quelante de metales bien conocido. En recientes estudios se han investigado derivados de 1,10-fenantrolina y su capacidad para quelar varios metales. Por ejemplo, Chao et al., han sintetizado 1,3-bis([1, 10] fenantrolina-[5,6-d]imidazol-2-il)bencono (mbpih2) y sus complejos de (bpy)2Ru2+ y han estudiado sus propiedades electroquímicas y espectroscópicas (Polyhedron, , 2000, 1975-1983). Liu et al., prepararon complejos de rutenio con 2-(2-hidroxifenil)imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina (HPIP) y estudiaron el comportamiento de unión de estos complejos al ADN de timo de ternero (JBIC, 2000, 5, 119-128). 2000, 5, 119-128). De un modo similar, Xu et al., han descrito la síntesis de prepararon complejos de

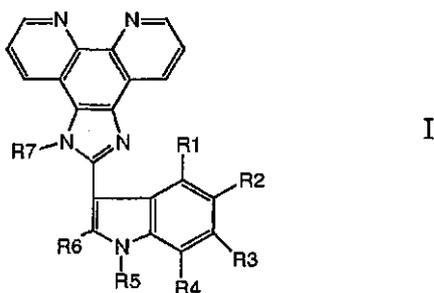
2-(4-metilfenil)imidazol[4,5-f]1,10-fenantrolina y sus complejos de ru(II) y la unión de los complejos preparados al ADN de timo de ternero (New J. Chem., . 2003, 27, 1255-1263).

5 La solicitud de patente internacional nº PCT/IB04/052433 (WO 2005/047266) describe una amplia clase de compuestos de imidazol 2,4,5-trisustituídos, incluidos algunos compuestos sustituidos de 1,10-fenantrolina., y su uso en el tratamiento del cáncer. El documento US 2004/0176601 divulga derivados de Benzimidazo [4,5-f] isoquinolinona como inhibidores de Jok.

10 Esta información básica se proporciona con el fin de proporcionar información conocida que el solicitante cree que tiene una posible importancia en la presente invención. No necesariamente se pretende admitir, ni interpretar, que toda la información precedente constituye la técnica anterior contra la presente invención.

Sumario de la invención

15 Un objeto de la presente invención es proporcionar derivados de 2-indolil imidazo[4,5-d]fenantrolina y usos de los mismos en el tratamiento del cáncer. De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto que tiene la de fórmula estructural (I) , o una sal del mismo para uso, en la inhibición de la proliferación de las células cancerosas:



20 en la que:

R1, R3, R4, R5 y R7 son hidrógeno, R2 es halógeno, y R6 es alquilo C₁-C₄

25 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto que tiene la de fórmula estructural (I) , o una sal del mismo para uso en la inducción de la apoptosis en una célula cancerosa.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto que tiene la de fórmula estructural (I) , o una sal del mismo para uso en la quelación de iones de metales de transición en una célula.

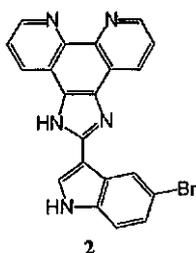
30 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto que tiene la de fórmula estructural (I) , o una sal del mismo para uso en el incremento de la expresión de un factor de tipo Krüppel (KLF4) en una célula de cáncer y/o en un tumor.

35 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto que tiene la de fórmula estructural (I) , o una sal del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

Breve descripción de los dibujos

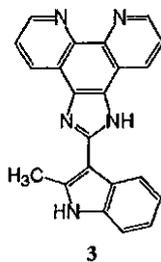
40 Estas y otras características de la invención serán más evidentes en la siguiente descripción detallada en la que se hace referencia a las figuras adjuntas, en las que: los compuestos no cubiertos por la fórmula (I) de la reivindicación 1 son ejemplos de referencia.

La Figura 1 representa los valores promedio y medio de GI₅₀ para la proliferación del compuesto 2 y el compuesto 3 en una serie de líneas de células cancerosas in vitro.

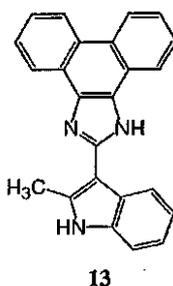


45

La Figura 2 presenta el efecto del compuesto 3 sobre la proliferación de una serie de líneas de células cancerosas *in vitro*.



5 La Figura 3 representa el efecto de iones metálicos sobre la capacidad del compuesto 3 y el compuesto 13 para inhibir el crecimiento de células HT29 *in vitro*.



10 La Figura 4 representa el efecto de iones de cobre sobre la capacidad del compuesto 3 para inhibir el crecimiento de células HT29 *in vitro*.

15 La Figura 5 representa el efecto de iones de cobre sobre la capacidad del compuesto 3 para inhibir el crecimiento de células HT29 *in vitro*. (A) Efecto de los iones de cinc; (A) Efecto de los iones de cobre; (C) Efecto de los iones de hierro (II); (D) Efecto de los iones de hierro; (E) Efecto de los iones de magnesio; ; y (F) Efecto de los iones de calcio.

La Figura 6 representa el efecto de iones de cobre o de cinc sobre la capacidad del compuesto 5 (A) y del compuesto 7 (B) para inhibir el crecimiento de células HT29 *in vitro*.

20 La Figura 7 representa el efecto del compuesto 3 sobre la expresión del ARNm del gen de la metalotioneína en células HT29 *in vitro*.

La Figura 8 representa el efecto del compuesto 3 sobre la expresión del ARNm de KLF4 en células HT29 *in vitro*.

25 La Figura 9 representa el efecto del compuesto 3 sobre la expresión del ARNm de KLF4 en células HT29 *in vitro*.

La Figura 10 representa el efecto del compuesto 3 sobre la expresión del ARNm de KLF4 en células HT29 *in vitro*.

30 La Figura 11 representa la capacidad del compuesto 3 para bloquear la progresión del ciclo celular en células HT29 (A) y en células CCRF-CEM (B) *in vitro*.

La Figura 12 presenta la capacidad del compuesto 3 para inducir la apoptosis en células CCRF-CEM *in vitro*.

35 La Figura 13 representa la capacidad del compuesto 3 para disminuir el tamaño del tumor (A) y el peso del tumor (B) en un modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma de colon.

La Figura 14 representa la capacidad del compuesto 3 para disminuir el tamaño del tumor (A) y el peso del tumor (B) en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón macrocítico.

40 La Figura 15 representa la de los compuestos 3, 5, y 7 para disminuir el tamaño del tumor (A) y el peso del tumor (B), e n un modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma de colon.

La Figura 16 representa la de los compuestos 3, 5, y 7 para disminuir el tamaño del tumor (A) y el peso del tumor (B) en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón.

La Figura 17 representa el efecto del compuesto 3 sobre los niveles de ARNm de KLF4 *in vivo* en tumores de un modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma de colon.

La Figura 18 representa el efecto del compuesto 3 sobre los niveles de ARNm de KLF4 *in vivo* en tumores de un modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma de colon.

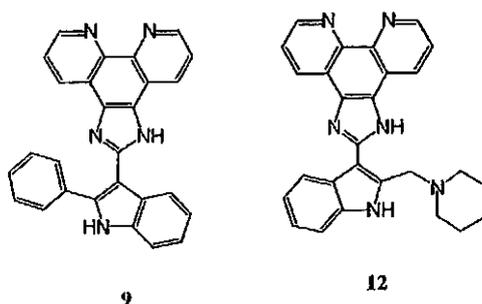
La Figura 19 representa el efecto del compuesto 3 sobre la expresión del ARNm de KLF4 en células HT29 *in vivo*, en tumores de un modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma de colon (A).

La Figura 20 representa una comparación del efecto del compuesto 3 sobre los niveles de *KLF4*, p21, y ciclina D1 en un modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma de colon.

La Figura 21 representa la localización subcelular del compuesto 3 en células HT-29 *in vitro*. (A) Células tratadas con el compuesto 3 durante 5 minutos; (B) y (C) células tratadas durante 4 horas. Para (A) y (B), las imágenes de contraste de interferencia diferencial se superpusieron con imágenes fluorescentes. (B) y (C) son las mismas imágenes.

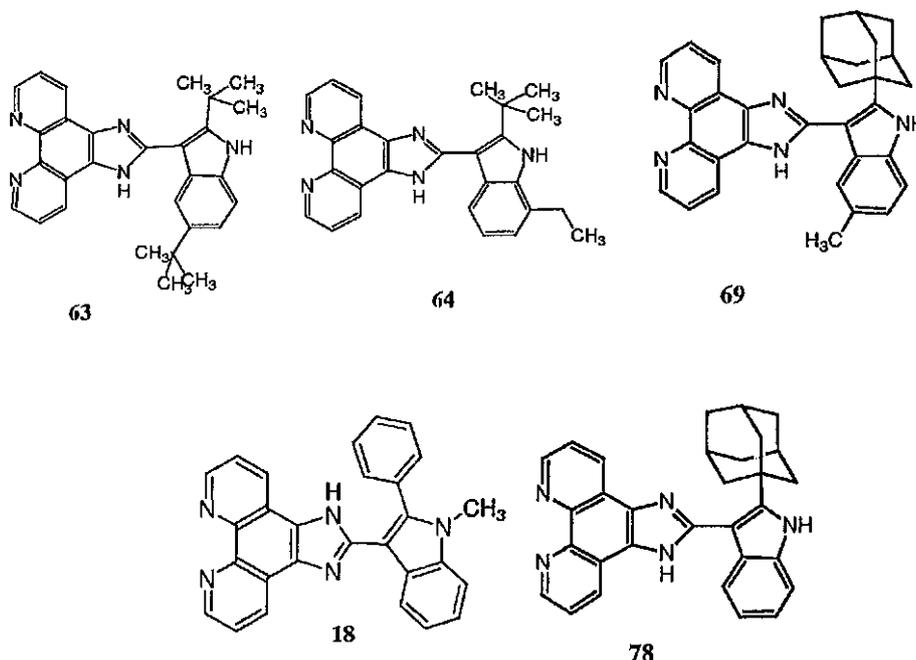
La Figura 22 representa la capacidad de los compuestos 3 y 13 para escindir el ADN (A) en ausencia de iones; (B) en presencia de iones de cobre, cinc o hierro (II); y (C) en presencia de varias cantidades de cobre.

La Figura 23 representa la de los compuestos 3, 5, 7, 9, 12 y 13 para escindir el ADN.



La Figura 24 representa el desarrollo de compuestos de Fórmula I.

La Figura 25 representa la capacidad de los compuestos 3 y 7 para inhibir el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón macrocítico (A) y en un modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma de colon (B), la capacidad del compuesto 7 para inhibir el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón macrocítico (C) y la capacidad de los compuestos 7, 63, 64, 69, 72, 73, 74, 18 y 78 para inhibir el crecimiento de células tumorales en el modelo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón macrocítico (D).



La Figura 26 representa el efecto de suplementos de iones metálicos sobre la inhibición del crecimiento celular mediada por el compuesto 3, Zn^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+2} (A) y Fe^{+3} , Ca^{+2} y Mg^{+2} (B).

La Figura 27 representa el análisis del ciclo celular en células HT-29 tratadas con el compuesto 3 (A) y el compuesto 7 (B).

5 La Figura 28 representa la propiedad de quelación de metales del compuesto 3 y el compuesto 7 in vitro en presencia de $ZnCl_2$ (A), $CuCl_2$ (B) y $FeCl_2$ (C).

10 Figura 29 representa los cambios en la expresión de genes sensibles a metales del gen sensible a cinc de la metalotioneína 1A (A), el transportador de cobre 1 sensible a cobre (B) y el receptor 1 de la transferrina sensible a hierro (C) en células HT-29 tratadas con el compuesto 3, el compuesto 7 o los respectivos quelantes específicos de metales.

15 La Figura 30 representa secuencias de ADN de unión a MTF-1 en el promotor del gen de la ciclina D1 (A) y los niveles de expresión de MTF-1 y ciclina D1 en tejido de xenoinjerto de cáncer de colon HT-29 tratado con el compuesto 3 (B) y el compuesto 7 (C).

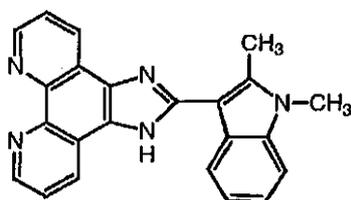
20 La Figura 31 representa la expresión de MTF-1 (A) y de ciclina D1 (B), medida mediante RT-PCR después del tratamiento con el compuesto 3 en células HT-29, y la expresión de MTF-1 (C) y de ciclina D1 (D) después de la inactivación del gen de MTF-1 por ARNsi.

La Figura 32 representa los sitios de unión del factor de transcripción en el promotor del gen de *KF4* (A) y las actividades de unión al ADN de Sp1 (B) y KLF4 (C) en células HT-29 tratadas con el compuesto 3.

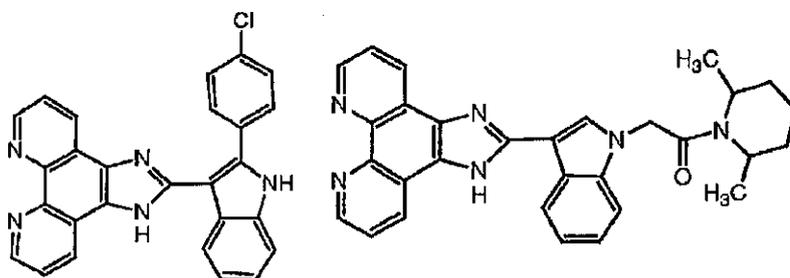
25 La Figura 33 representa los sitios de unión del factor de transcripción en el promotor del gen de la ciclina D1 (A) y la unión in vivo de *KLF4* y Sp1 al promotor de la ciclina D1 después del tratamiento con el compuesto 3 en células HT-29 mediante ensayo de inmunoprecipitación con cromatina (B).

30 La Figura 33 representa el efecto del compuesto 3 y la inactivación del gen de *KLF4* por el ARNsi en células HT-29 sobre la expresión génica medida mediante RT-PCR (A) y sobre la proliferación celular (B).

La Figura 35 representa la de los compuestos 7, 41, 42, 50, 52, 53, 54, 55 y 4 para inhibir el crecimiento de células tumorales en el modelo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón macrocítico.



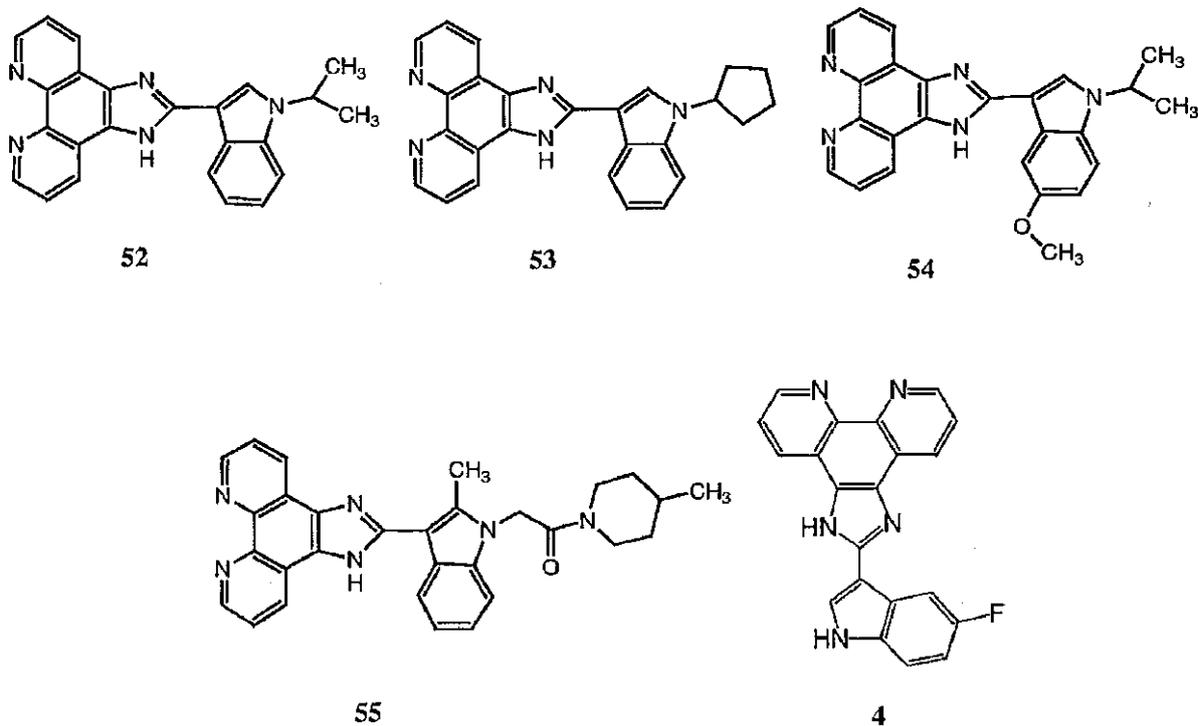
41



42

50

35



- 5 La Figura 36 representa la capacidad del compuesto 3 para quelar los iones de cinc *in vitro* usando el pigmento Zinquin sensible a cinc.
- La Figura 37 representa la capacidad del compuesto 3 para quelar los iones de cinc *in vitro* en células HT-29 precargadas con ZnCl₂ (A) o sin precarga de ZnCl₂ (B) (iones endógenos de cinc).
- 10 La Figura 38 representa el efecto del compuesto 3 sobre la expresión del gen sensible a metales el gen sensible a cinc de la metalotioneína 1A en células HT-29 *in vitro* en el tiempo (A) y tras el tratamiento con suplemento de cinc (B).
- 15 La Figura 39 representa el efecto del compuesto 3 sobre la expresión del KLF4 supresor tumoral sensible a metales en células HT-29 *in vitro* en el tiempo (A) y tras el tratamiento con suplemento de cinc (B).
- La Figura 40 representa el efecto del compuesto 3 sobre la expresión de del factor de transcripción de unión al elemento respondedor a metales (MRE) en células HT29 *in vitro* en el tiempo.
- 20 La Figura 41 es el efecto de la inactivación del gen de MTF-1 mediante tratamiento con ARNsi en células HT-29 *in vitro* sobre la expresión de MTF-1, KLF5 y *KLF4* (A) y el efecto del tratamiento con el compuesto 3 sobre la expresión de KLF5 en células HT-29 *in vitro* en el tiempo (B).
- 25 La Figura 42 representa el efecto del compuesto 3 sobre la expresión de la proteína reguladora del ciclo celular p21 en células HT-29 *in vitro* en el tiempo, los niveles de ARNm (A) y los niveles proteicos (B).
- La Figura 43 representa el efecto del compuesto 3 sobre la expresión de los niveles de ARNm de la ciclina D1 en células HT-29 (A) y los niveles proteicos (B).
- 30 La Figura 44 representa el efecto del compuesto 3 sobre la expresión de un gen supresor tumoral, la proteína temprana de la respuesta de crecimiento (EGR-1) en células HT-29 *in vitro* en el tiempo (A) y tras el tratamiento con suplemento de cinc (B).
- 35 La Figura 45 representa el efecto del compuesto 3 y el compuesto 7 sobre los niveles de expresión de MT1A, MTF-1, *KLF4*, KLF5, p21, ciclina D1 y Erg-1 en células HT-29 *in vitro*.
- La Figura 46 representa el efecto *in vivo* del compuesto 3 sobre los niveles de *KLF4* y ciclina D1 en un modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma de colon HT-29 en ratones.
- 40 La Figura 47 representa la capacidad del compuesto 3 para quelar cinc a partir de la proteína de almacenamiento de cinc metalotioneína 1 (MT-1) *in vitro*.

La Figura 48 representa la inactivación de la actividad de unión al ADN de la MTF-1 activada por cinc tras el tratamiento con el compuesto 3 *in vitro* (A) y la inactivación de la actividad de unión al ADN de MTF-1 mediante el compuesto 3 en células HT-29 *in vitro* (B).

5 La Figura 49 representa la capacidad del compuesto 3 para disminuir la actividad de unión al ADN de la MTF-1 en células HT-29 a la región promotora de la ciclina D1 mediante ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

La Figura 50 representa el efecto del compuesto 3 y el suplemento de cinc sobre la expresión de ciclina D1 en células HT-29 *in vitro* (A) y el efecto del compuesto 3 sobre los niveles proteicos de la ciclina D1 y otras ciclinas (B).

10 La Figura 51 representa el efecto del compuesto 3 y el suplemento de cinc sobre los niveles de expresión de MTF-1 (A), el efecto del suplemento de cinc sobre la expresión de ciclina D1 (B) y el efecto del suplemento de cinc y la inactivación del gen de MTF-1 mediante ARNsi sobre la expresión de ciclina D1 (C) en células HT-29 *in vitro*.

15 La Figura 52 representa el efecto del compuesto 3 y la inactivación del gen de MTF-1 mediante ARNsi sobre la expresión de KLF4 en células HT29 *in vitro*.

La Figura 53 representa la comparación de los niveles de expresión génica de *KLF4*, en células de cáncer H-460 *in vitro* (A) y el efecto del compuesto 3 y el compuesto 7 sobre la expresión de *KLF4*, *KLF2* y *KLF6* en H-460 en células cancerosas H-460 *in vitro* (B).

20 La Figura 54 representa la capacidad del compuesto 3 para disminuir el tamaño del tumor (A) en un modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma de colon y el efecto sobre los niveles de ARNm de MTF-1, ciclina D1 *in vivo* en tumores de un modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma de colon (B).

25 La Figura 55 representa el efecto del compuestos 3, el compuesto 7 y el suplemento de cinc sobre los niveles de ARNm en células HT-29 *in vitro* para MT1A (A), MTF-1 (B), ciclina D1 (C) y *KLF4* (D).

30 La Figura 56 representa la propiedad de quelación de metales del compuesto 3 y el compuesto 64 *in vitro* en presencia de ZnCl₂ (A) CuCl₂ (B) y FeCl₂ (C).

La Figura 57 representa el efecto del compuestos 3, el compuesto 64 y el suplemento de cinc sobre los niveles de ARNm en células HT-29 *in vitro* para MT1A (A), MTF-1 (B), ciclina D1 (C) y *KLF4* (D).

35 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de 2-indolilimidazo[4,5-d]fenantrolina de fórmula I. Los compuestos de fórmula I, como se demuestra en el presente documento, son capaces de quelación intracelular de metales de transición y de ejercer efectos antiproliferativos en una o más células de cáncer, que son citostáticos y/o citotóxicos. De acuerdo con lo anterior, una realización de la presente invención proporciona el uso de compuestos de fórmula I para inhibir la proliferación de las células cancerosas. La presente invención proporciona además procedimientos y usos de compuestos de fórmula I en el tratamiento del cáncer.

45 La inducción de la muerte celular programada (apoptosis) es un abordaje útil para el tratamiento del cáncer. Como se demuestra en el presente documento, en una realización de la presente invención, los compuestos de fórmula I son capaces de inducir apoptosis en células de cáncer y, por tanto, pueden ejercer un efecto citotóxico. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona además procedimientos y usos de los compuestos de fórmula I para la inducción de apoptosis en células cancerosas. En otra realización, se proporciona el uso de compuestos de fórmula I para la inducción de apoptosis para el tratamiento de varias leucemias.

50 En otra realización de la presente invención, los compuestos de fórmula I son capaces de inhibir de forma selectiva la proliferación de una o más células de cáncer de próstata, células de cáncer de colon, células de cáncer de pulmón macrocítico y células de leucemia. En esta realización, por tanto, la presente invención proporciona el uso de compuestos de fórmula I para inhibir la de forma selectiva la proliferación de una o más células de cáncer de próstata, células de cáncer de colon, células de cáncer de pulmón macrocítico y células de leucemia. La capacidad de los compuestos de fórmula I para inhibir de forma selectiva la proliferación de una o más células de cáncer de próstata, células de cáncer de colon, células de cáncer de pulmón macrocítico y células de leucemia proporciona adicionalmente procedimientos y usos de los compuestos de fórmula I para tratar un cáncer seleccionado del grupo de cáncer de próstata, cáncer de colon, células de cáncer de pulmón macrocítico y células de leucemia.

60 Tal como se ha señalado anteriormente, los compuestos de fórmula I son capaces de quelar iones de metales de transición en un ambiente celular. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona además procedimientos y usos de los compuestos de fórmula I para quelar iones de metales de transición *in vivo* o *in vitro*. En una realización de la presente invención, los compuestos de fórmula I son capaces de alterar la expresión de genes que están regulados por metales de transición en células de cáncer mediante quelación de metales de transición. Por ejemplo, en una realización, los compuestos de fórmula I son capaces de aumentar la expresión de un gen supresor

tumoral regulado por metales de transición en células de cáncer. La función de los genes supresores tumorales a menudo se asocia con la regulación de la proliferación celular y, por tanto, aumentando la expresión de un gen supresor tumoral regulado por metales de transición, que funciona para regular la proliferación celular, los compuestos de fórmula I son capaces de inhibir la proliferación de las células cancerosas. En una realización específica, los compuestos de fórmula I son capaces de aumentar la expresión de del gen supresor tumoral regulado por cinc, *KLF4* y, por tanto, sin útiles en la inhibición de la proliferación de células cancerosas en las que *KLF4* actúa como supresor tumoral, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de vejiga, cánceres del tracto gastrointestinal y varias leucemias.

La presente invención proporciona además complejos de quelatos metálicos de compuestos de fórmula I, por ejemplo complejos de cobre de compuestos de fórmula I y el uso de estos complejos en el tratamiento del cáncer.

La presente invención también contempla compuestos de fórmula I en el tratamiento de enfermedades o trastornos en los que existe la necesidad de quelar metales de transición, así como en varias situaciones no terapéuticas en las que se requiere quelación de metales de transición.

Definiciones

A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención.

Los términos se definen del siguiente modo:

“Inhibición selectiva” como se usa en el presente documento con referencia a la actividad anticáncer de los compuestos de Fórmula I, en una realización de la invención, se puede determinar usando un panel de líneas celulares de cáncer que comprende al menos 50 de las 60 líneas de células de cáncer utilizadas en el Programa de Desarrollo de Terapéuticas del NCI / NIH *in vitro* (que se muestra en la Tabla 1 a continuación), en el que el panel comprende las líneas celulares de cáncer de próstata de la lista y por lo menos 4 líneas celulares de cada uno de los otros tipos de cáncer indicados. Se dice que un compuesto muestra inhibición selectiva de un cáncer seleccionado (es decir, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón macrocítico y / o leucemia) cuando el compuesto inhibe la proliferación de las líneas celulares del cáncer seleccionado con un promedio del GI50 al menos un 10% más bajo que el promedio de GI50 para la inhibición de las líneas celulares de cada uno de cáncer de mama, cáncer del SNC, melanoma, cáncer de ovarios y cáncer renal.

Tabla 1: Líneas celulares de cáncer usadas en el Programa de Desarrollo de Terapéuticas del NCI / NIH *in vitro*

Tipo de cáncer	Línea celular	
Mama	MCF7	MDA-MB-435
	NCI/ADR-RES	MDA-N
	MDA-MB-231/ATCC	BT-549
	HS 578T	T-47D
SNC	SF-268	SNB-19
	SF-295	SNB-75
	SF-539	U251
Colon	COLO 205	HT29
	HCC-2998	KM12
	HCT-116	SW-620
	HCT-15	
Leucemia	CCRF-CEM	MOLT-4
	HL-60(TB)	RPMI-8226
	K-562	SR
Melanoma	LOX IMVI	SK-MEL-28
	MALME-3M	SK-MEL-5
	M14	UACC-257
	SK-MEL-2	UACC-62
De pulmón macrocítico	A549/ATCC	NCI-H23
	EKVX	NCI-H322M
	HOP-62	NCI-H460
	HOP-92	NCI-H522
	NCI-H226	
De ovarios	IGR-OV1	OVCAR-5
	OVCAR-3	OVCAR-8
	OVCAR-4	SK-OV-3

Tipo de cáncer	Línea celular
Próstata	PC-3 DU-145
Renal	786-0). A498 ACHN CAKI-1
	RXF 393 SN12C TK-10 UO-31

5 La expresión "regulado por disminución" como se usa en el presente documento con respecto a la expresión de un gen supresor de tumores de metales de transición en las células cancerosas, significa que el gen no se sobreexpresa en las células cancerosas, es decir, que las células exhiben un nivel reducido o sustancialmente el mismo nivel de expresión del gen en comparación con las células normales. A modo de ejemplo, las células de cáncer de colon exhiben una expresión reducida del gen KLF4 en comparación con las células de colon normales, mientras que las células de cáncer de próstata presentan el mismo nivel de expresión de KLF4 cuando se compara con las células de cáncer de próstata normales, pero el nivel de expresión es menor que en las células de cáncer de mama, q que sobreexpresan *KLF4*.

10 El término "halógeno" se refiere a átomos flúor, bromo, cloro, y yodo.

15 El término "hidroxilo" se refiere al grupo -OH.

El término "tiol" o "mercapto" se refiere al grupo-SH y -S(O)₀₋₂.

20 La expresión "alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada, o cíclico, de uno a ocho átomos de carbono.

25 La expresión "alquilo inferior sustituido" se refiere a alquilo inferior como se acaba de describir que incluye uno o más grupos tales como hidroxilo, tiol, alquiltiol, halógeno, alcoxi, amino, amido, carboxilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, acilo, arilo, arilo sustituido; ariloxi, hetarilo , hetarilo sustituido, aralquilo, heteroaralquilo, alquilalquenilo, alquilalquinilo, alquilocicloalquilo, alquilocicloheteroalquilo, nitro, ciano. Estos grupos pueden estar unidos a cualquier átomo de carbono del resto alquilo inferior.

30 La expresión "alquenilo inferior" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada de dos a ocho átomos de carbono que tienen al menos un doble enlace carbono - carbono.

35 La expresión "alquenilo inferior sustituido" se refiere a alquenilo inferior como se acaba de describir que incluye uno o más grupos tales como hidroxilo, tiol, alquiltiol, halógeno, alcoxi, amino, amido, carboxilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, acilo, arilo, arilo sustituido; ariloxi, hetarilo , hetarilo sustituido, aralquilo, heteroaralquilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilalquenilo, alquilalquinilo, alquilocicloalquilo, alquilocicloheteroalquilo, nitro, ciano. Estos grupos pueden estar unidos a cualquier átomo de carbono para producir un compuesto estable.

40 La expresión "alquinilo inferior" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada de dos a ocho átomos de carbono que tienen al menos un triple enlace carbono - carbono.

45 La expresión "alquinilo inferior sustituido" se refiere a alquenilo inferior como se acaba de describir que incluye uno o más grupos tales como hidroxilo, tiol, alquiltiol, halógeno, alcoxi, amino, amido, carboxilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, acilo, arilo, arilo sustituido; ariloxi, hetarilo , hetarilo sustituido, aralquilo, heteroaralquilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilalquenilo, alquilalquinilo, alquilocicloalquilo, alquilocicloheteroalquilo, nitro, ciano. Estos grupos pueden estar unidos a cualquier átomo de carbono para producir un compuesto estable.

50 El término "alcoxi" se refiere al grupo-OR, en el que R es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, acilo, arilo, arilo sustituido; aralquilo, aralquilo sustituido, heteroalquilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, o cicloheteroalquilo sustituido como se define a continuación.

El término "alquiltio" indica al grupo SR, -S(O)_{n=1-2} -R, en el que R es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido; aralquilo o aralquilo sustituido como se define a continuación.

55 El término "acilo" se refiere a grupos-C (O) R, en los que R es hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido;

El término "ariloxi" se refiere a grupos -OAr, en los que Ar es un arilo, arilo sustituido; heteroarilo, o grupo heteroarilo sustituido tal como se define a continuación.

5 El término "amino" se refiere al grupo NRR', en el que R y R' pueden ser independientemente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido; hetarilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, o hetarilo sustituido tal como se define a continuación o acilo.

10 El término "amido" se refiere al grupo C(O)NRR', en el que R y R' pueden ser independientemente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido; hetarilo, hetarilo sustituido tal como se define a continuación.

El término "carboxilo" se refiere al grupo C(O)OR, en el que R puede ser independientemente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, arilo, arilo sustituido; hetarilo, hetarilo sustituido y similares tal como se ha definido.

15 Los términos "arilo" o "Ar" se refieren a un grupo carbocíclico aromático que tiene al menos un anillo aromático (por ejemplo, fenilo o bifenilo) o múltiples anillos condensados, en los que al menos un anillo es aromático, (p. ej., 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, naftilo, antrilo, o fenantrilo, 9-fluorenilo, etc).

20 El término "arilo sustituido" se refiere a arilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos funcionales, (p. ej., halógeno, hidroxilo, tiol, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, trifluorometilo, alquenilo inferior, alquenilo inferior sustituido alquinilo inferior, alquinilo inferior sustituido, alquilalquenilo, alquilalquinilo, alcoxi, alquiltio, acilo, ariloxi, amino, amido, carboxilo, arilo, arilo sustituido; heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alquilcicloalquilo, alquilcicloheteroalquilo, nitro, sulfamido, ciano o-N = CRR', en el que R y R' se seleccionan independientemente de H, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido; heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido.

30 El término "heterociclo" se refiere a un grupo carbocíclico saturado, insaturado o aromático que tiene un solo anillo (por ejemplo, morfolino, piridilo o furilo) o múltiples anillos condensados (por ejemplo, naftiridilo, quinoxalilo, quinolinilo, indoliznilo, indanilo o benzo [b] tienilo) y que tiene al menos un heteroátomo, tal como N, O o S. dentro del anillo.

35 El término "heterociclo sustituido" se refiere a un heterociclo opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, tiol, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, trifluorometilo, alquenilo inferior, alquenilo inferior sustituido alquinilo inferior, alquinilo inferior sustituido, alquilalquenilo, alquilalquinilo, alcoxi, alquiltio, acilo, ariloxi, amino, amido, carboxilo, arilo, arilo sustituido; heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alquilcicloalquilo, alquilcicloheteroalquilo, nitro, , ciano o sulfamido y similares.

40 Los términos "heteroarilo" o "hetarilo" se refieren a un heterociclo en el que al menos un anillo heterocíclico es aromático.

45 El término "heteroarilo sustituido" se refiere a un heterociclo opcionalmente mono o poli sustituido con uno o más grupos funcionales, (p. ej., halógeno, hidroxilo, tiol, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, trifluorometilo, alquenilo inferior, alquenilo inferior sustituido alquinilo inferior, alquinilo inferior sustituido, alquilalquenilo, alquilalquinilo, alcoxi, alquiltio, acilo, ariloxi, amino, amido, carboxilo, arilo, arilo sustituido; heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alquilcicloalquilo, alquilcicloheteroalquilo, nitro, , ciano o sulfamido y similares.

50 El término "cicloalquilo" se refiere a un grupo alquilo cíclico o policíclico que contiene de 3 a 15 carbonos. Para los grupos policíclicos, éstos pueden ser anillos múltiples condensados en los que uno de los anillos distales puede ser aromático (por ejemplo, tetrahidronaftaleno, etc.).

55 El término "cicloalquilo sustituido" se refiere a un grupo cicloalquilo que comprende uno o más sustituyentes con, por ejemplo, halógeno, hidroxilo, tiol, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, trifluorometilo, alquenilo inferior, alquenilo inferior sustituido alquinilo inferior, alquinilo inferior sustituido, alquilalquenilo, alquilalquinilo, alcoxi, alquiltio, acilo, ariloxi, amino, amido, carboxilo, arilo, arilo sustituido; heterociclo, heteroarilo, heterociclo sustituido, heteroalquilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alquilcicloalquilo, alquilcicloheteroalquilo, nitro, ciano o sulfamido y similares.

60 Los términos "terapia" y "tratamiento", como se usa indistintamente en el presente documento, , se refieren a una intervención realizada con la intención de aliviar los síntomas asociados con, la prevención del desarrollo de, o alterar la patología de, una enfermedad, trastorno o afección. Por tanto, los términos terapia y tratamiento términos se usan en el sentido más amplio, e incluyen prevención (profilaxis), moderación, gestión, reducción o curación de una enfermedad, trastorno o afección en varias etapas. La prevención o reducción de la progresión de una enfermedad, trastorno o afección están abarcadas por estos términos. También abarca estos términos una intervención que resulta en una alteración de la fisiología y / o bioquímica de un sujeto vivo. Los sujetos que necesitan la terapia / tratamiento incluyen aquellos que ya tienen la enfermedad, trastorno o afección, así como aquellos propensos a, o en riesgo de desarrollar, la enfermedad, trastorno o afección, y aquellos en los que la enfermedad, trastorno o condición se ha de

evitar. La aplicación terapéutica de los compuestos de la invención, por tanto, se refiere a una terapia o tratamiento, como se define en el presente documento.

5 Los términos "sujeto" o "paciente" como se usa en el presente documento, se refieren a un animal que necesite el tratamiento, incluyendo seres humanos y otros mamíferos.

10 La administración de los compuestos de la invención "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales, se pretende que incluya la administración simultánea (concurrente) y la administración consecutiva. La administración consecutiva se pretende que abarque varias órdenes de la administración del agente terapéutico (s) y el compuesto (s) de la invención al sujeto.

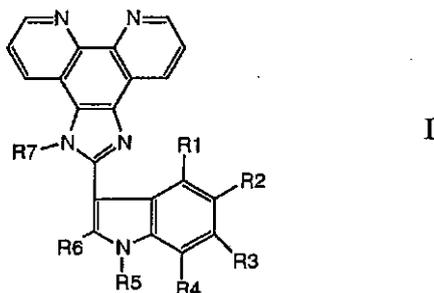
15 La expresión "terapia adyuvante," tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un tratamiento que se añade para aumentar la eficacia de un tratamiento primario. En el cáncer, la terapia adyuvante se refiere generalmente a la quimioterapia, terapia hormonal o terapia de radiación después de la cirugía (terapia primaria) para aumentar la probabilidad de matar todas las células cancerosas.

20 La expresión "terapia neoadyuvante," tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un tratamiento que se da antes de que el tratamiento primario. Ejemplos de terapia neoadyuvante incluyen quimioterapia, terapia de radiación, y la terapia hormonal.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a una variación de + / -10 % del valor nominal. Debe entenderse que tal variación se incluye siempre en cualquier valor dado proporcionado en el presente documento, se haga o no referencia específica al mismo.

25 *1. Compuestos de 2-Indolil imidazo[4,5-d]fenantrolina*

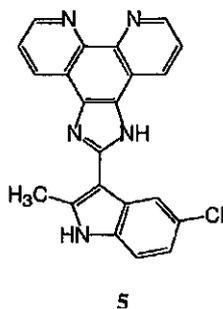
La presente invención proporciona compuestos de la fórmula general (I):

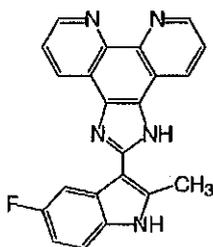


30 o sales de los mismos. en la que:

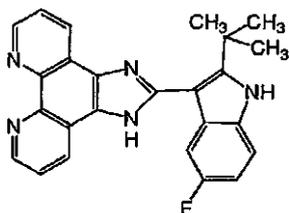
R1, R3, R4, R5 y R7 son H, es halógeno; y R6 es alquilo C₁-C₄

Los compuestos de la presente invención incluyen, entre otros, los siguientes compuestos de ejemplo:

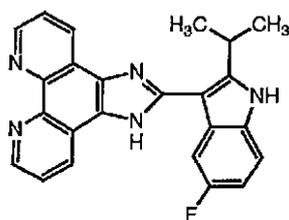




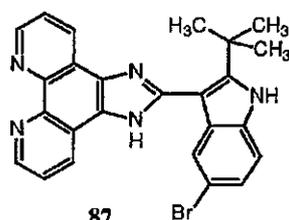
7



65



82



87

5

La presente invención incluye varias sales de los compuestos definidos por la Fórmula I, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables. Los compuestos según la presente invención pueden poseer grupos funcionales suficientemente ácidos, suficientemente básicos o ambos grupos funcionales, y, de acuerdo con esto reaccionar con un número de bases orgánicas e inorgánicas, y ácidos orgánicos e inorgánicos, para formar sales farmacéuticamente aceptables.

10

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento se refiere a una sal de un compuesto de Fórmula I, que es sustancialmente no tóxico para los organismos vivos. Las sales farmacéuticamente aceptables típicas incluyen las sales preparadas mediante la reacción del compuesto de la presente invención con un mineral farmacéuticamente aceptable o ácido orgánico o una base orgánica o inorgánica. Tales sales se conocen como sales de adición de ácido y de adición de base.

15

Los ácidos de uso habitual para formar sales de adición de ácido son ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y similares, y ácidos orgánicos, tales como ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenil-sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético, y similares. Ejemplos de sales ácidas adecuadas incluyen sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formiato, clorhidrato, diclorhidrato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butino-1,4-dioato, hexino-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, hidroxibenzoato metoxibenzoato, ftalato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, gamma-hidroxi-butilato, glucolato, tartrato, metanosulfonato propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato mandelato y similares.

20

25

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables preferidas son las formadas con ácidos minerales tales como ácido clorhídrico y ácido bromhídrico, y especialmente las formadas con ácidos orgánicos tales como ácido maleico y ácido metanosulfónico.

5 Las sales de grupos amina pueden comprender también sales de amonio cuaternario en las que el nitrógeno del amino porta un grupo orgánico adecuado tal como un alquilo, alqueno inferior, alqueno inferior sustituido alquino inferior, alquino inferior sustituido, o un resto aralquilo.

10 Sales de adición de bases incluyen las derivadas de bases inorgánicas, tales como amoníaco o hidróxidos de metales alcalinos o alcalino térreos, carbonatos, bicarbonatos, y similares. Por tanto, dichas bases útiles en la preparación de las sales de la presente invención incluyen hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido amónico, carbonato potásico, carbonato sódico, bicarbonato sódico, bicarbonato potásico, hidróxido cálcico, carbonato cálcico, y similares.

15 Un experto en la técnica entenderá que el contraion particular que forma una parte de cualquier sal de la presente invención normalmente no es de naturaleza crítica, siempre y cuando la sal como un todo sea farmacológicamente aceptable y siempre que el contraion no contribuya a calidades no deseadas para la sal como un todo. La presente invención abarca además los solvatos farmacéuticamente aceptables de un compuesto de Fórmula I. Muchos de los compuestos de Fórmula I pueden combinarse con disolventes tales como agua, metanol, etanol y acetonitrilo para formar solvatos farmacéuticamente aceptables tales como el hidrato correspondiente, metanolato, etanolato y acetonitrilato.

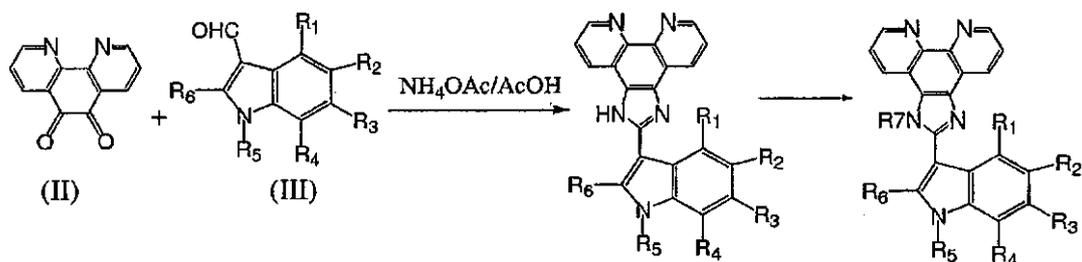
20 Los compuestos de la presente invención pueden tener múltiples centros asimétricos (quirales). Como consecuencia de estos centros quirales, los compuestos de la presente invención se producen como racematos, mezclas de enantiómeros y como enantiómeros individuales, así como diastereómeros y mezclas de diastereómeros. Todas las formas asimétricas, isómeros individuales y combinaciones de los mismos entran dentro del ámbito de la presente invención.

30 Un experto en la técnica entenderá fácilmente que si la estereoquímica de un compuesto de Fórmula I es crítico para su actividad, así, la estereoquímica relativa del compuesto se estableció temprano durante la síntesis para evitar problemas de separación de estereoisómeros posteriores. Además la manipulación de la molécula será entonces emplear procedimientos estereoespecíficos a fin de mantener la quiralidad deseada.

II. Preparación de los compuestos de fórmula I

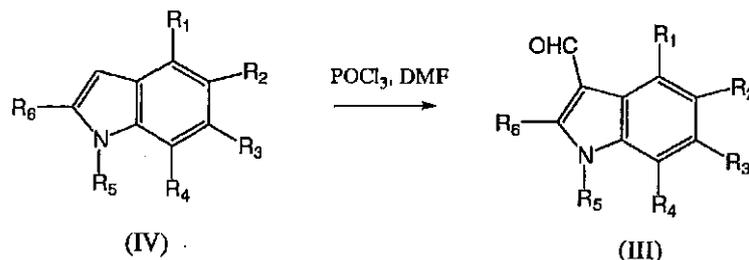
35 Como se conoce en la técnica, los compuestos de la presente invención se pueden preparar por un número de técnicas estándar. Los compuestos de Fórmula I, por tanto, se pueden preparar mediante varios métodos sintéticos, por ejemplo, como describen (Grimmett, M.R., Comprehensive Heterocyclic Chemistry: The Structure, Reaction, Synthesis and Uses of Heterocyclic Compounds, A. R. Katrizky y C. W. Rees, eds., Vol. 5, Pergamon Press, Oxford, 1984, pp. 457-498; (Grimmett, M. R., Imidazole and Benzimidazole Synthesis, Academic Press, San Diego CA, 1997).

40 En una realización de la presente invención, los compuestos de fórmula I se preparan mediante síntesis en solución o en fase sólida, mediante reacción de una diona de Fórmula II con el aldehído (III) en presencia de acetato de amonio en ácido acético (véase, por ejemplo, Krieg et al., Naturforsch. 1967, 22b, 132; Sarshar et al., Tetrahedron Lett. 1996, 37, 835-838). Bian et al., Synthetic Communications 2003, 33, 3477-3482). Hong Xu et al., J. Chem. Soc., Dalton Trans., 2003, 11, 2260-2268). Hong Xu et al., Inorg. Chem. Commun., 2003, 6, 766-768). Bian et al., Polyhedron 2002, 21, 313-319). Chao et al., J. Chem. Soc., Dalton Trans., 2001, 12, 1920-1926.



50 Los compuestos de fórmula (II) y (III) están disponibles comercialmente o se pueden preparar usando procedimientos estándar conocidos por un experto en la técnica relevante. Los compuestos de Fórmula (II) se pueden preparar mediante varios métodos sintéticos, por ejemplo, como describen Fischer et. al (J. Am. Chem. Soc. 1961, 83, 4208-4210). Guijarro et al. (J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 4155-4157). Chi et. al. (Synth. Comm. 1994, 2415). 2119-2122) y Armesto et. al. (Synthesis, 1988, 799-801). Yamada et. al. (Bull. Soc Chem. Jpn., 1990, 63, (9), 2710-2712). Hiort et. al. (J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 3448-3454). y Tetrahedron Letters 2004, 4533). 6361-6363). Los compuestos de fórmula (III) se pueden preparar mediante métodos sintéticos generales descritos por Vilsmeier et. al. (Chem. Ber. 1958, 91, 850-861 and Synthesis 1985, 8, 641-645). Por ejemplo, los compuestos de fórmula (III) se

pueden preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (IV) con POCl_3 en dimetilformamida (DMF) como se muestra a continuación:



5 La separación y purificación de los productos (1) se basa generalmente en su propiedad para formar sales solubles en agua. Después de que el medio de reacción se diluye con agua, las impurezas se extraen de la solución obtenida con un disolvente no polar, la capa acuosa se basicifica y la imidazo [4,5-d] fenantrolina (1) separada se filtra y se recristaliza en un disolvente adecuado.

10 *Análisis de los compuestos de fórmula I*

Como se ha descrito en lo que antecede, los compuestos de Fórmula I contemplados para uso en los métodos de la presente invención son capaces de quelar metales de transición y de inhibir la proliferación de células cancerosas. Además, en una realización de la presente invención, los compuestos de fórmula I son capaces de aumentar la expresión de un gen supresor tumoral regulado por metales de transición, tal como *KLF4*, en células de cáncer. En una realización adicional de la presente invención, los compuestos de fórmula I inducen apoptosis en las células cancerosas y ejercen un efecto citotóxico sobre las células cancerosas.

La capacidad de un compuesto de Fórmula I candidato para quelar metales de transición e inhibir la proliferación celular neoplásica *in vitro* e *in vivo* puede analizarse utilizando técnicas estándar conocidas. De un modo similar, la capacidad de los compuestos para aumentar la expresión de un gen supresor de tumores y / o inducir apoptosis en células de cáncer se puede analizar usando técnicas estándar. Ejemplos de métodos de análisis de los compuestos candidatos de Fórmula I se proporcionan a continuación y en los ejemplos incluidos en el presente documento. Un experto en la técnica entenderá que otros métodos de análisis de los compuestos son conocidos en la técnica y también son adecuados para el ensayo de compuestos candidatos.

Los compuestos de Fórmula I que demuestran actividad inhibidora pueden analizarse además *in vitro* y / o *in vivo* en combinación con varios agentes quimioterapéuticos conocidos para evaluar su uso potencial en terapias de combinación.

Complejos de quelato metálico de los compuestos de Fórmula I también se contemplan en la presente invención. Tales complejos de quelatos también pueden analizarse usando los métodos descritos a continuación.

35 *a. Capacidad de quelación de metales*

De acuerdo con la presente invención, los compuestos de fórmula I son capaces de quelar iones de metales de transición en un ambiente celular. En una realización, los compuestos de fórmula I son capaces de quelar iones de hierro, cinc, cobre, rutenio y cobalto. En una realización adicional, los compuestos de fórmula I son capaces de quelar metales de transición de la primera fila. En una realización adicional, los compuestos de fórmula I son capaces de quelar iones de hierro, cinc y cobre. En otra realización de la presente invención, los compuestos de fórmula I son capaces de quelar iones de cinc. En otra realización, los compuestos de fórmula I son capaces de quelar iones de cobre.

Las propiedades quelantes de metales de los compuestos de Fórmula I se pueden determinar usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo, entre otros, cristalografía de rayos X, espectroscopia RMN, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de absorción atómica (AAS), espectroscopia de resonancia paramagnética de electrones, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía de líquidos combinada con espectrometría de masas y valoraciones potenciométricas.

Por ejemplo, el ácido peracético (PAA) se descompone rápidamente en presencia de iones de metales tales como manganeso, hierro o cobre. La eficacia de un compuesto quelante para estabilizar soluciones de PAA en presencia de iones metálicos se puede evaluar para determinar la capacidad quelante de metal del compuesto. Brevemente, se puede preparar una solución de agua que contiene iones metálicos y se añadió a la solución la cantidad apropiada de un compuesto candidato de Fórmula I, seguido de ajuste del pH y la temperatura. A la estabilidad de las soluciones de PAA que contienen los compuestos de Fórmula I se puede seguir la valoración yodométrica. Otras pruebas para determinar la capacidad de quelación de metales pueden incluir, por ejemplo, la medición de iones de metal no quelados en una solución que contiene iones metálicos y un compuesto quelante, con un electrodo selectivo de iones

de metal. Brevemente, una solución que contiene un metal se valora con una solución que contiene un compuesto quelante seguido de la medición con un electrodo selectivo de metales para determinar la cantidad de iones metálicos no quelados, proporcionando de ese modo una indicación de la capacidad quelante de metales de los compuestos de Fórmula I.

5 La propiedad de quelación de metales de los compuestos de Fórmula I también puede evaluarse espectrofotométricamente utilizando el ensayo de unión a metales de 4-(2-piridilazo) resorcinol (PAR) *in vitro*. El PAR es un colorante disponible comercialmente que se comporta como un ligando terdentado o bidentado para formar complejos coloreados solubles o insolubles con cationes de Mg, Al, Ca, Sr, Ba, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Y, Zr, Nb, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Hf, Ta, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Th, U, Np y los lantánidos a valores de pH específicos, con una absorbancia máxima a aproximadamente 500 nm. Para determinar la propiedad de metal-quelación de los compuestos de Fórmula I, los complejos de iones metálicos-PAR resultantes que se forman en presencia de iones metálicos, se pueden medir espectrofotométricamente a aproximadamente 500 nm y se puede realizar una comparación entre complejos de iones de metal-PAR que se forman en las muestras que contienen compuestos de fórmula I y las muestras de control, por ejemplo, en muestras que contienen un quelante y / o muestras conocidas que no contiene los compuestos de Fórmula I, pero que contiene un vehículo de control.

La capacidad de los compuestos de Fórmula I para quelar metales de transición en un entorno celular se puede evaluar usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la medición de conjuntos quelables de cinc, hierro o cobre intracelular en presencia y ausencia de un compuesto candidato usando indicadores fluorescentes específicos, como zinquin o Phen Green SK (véase, por ejemplo, Zalewski et al., *Biochem J.* 1993, 296 (Pt 2), 403-8). y Petrat et al., *Biol Chem.* 2002, 383(3-4), 489-502). Además, la capacidad quelante de metales de los compuestos de Fórmula I en un entorno celular se puede evaluar en varias muestras biológicas, tales como extractos celulares, células aisladas, tejidos, o fluidos corporales, mediante la medición de conjuntos quelables de iones metálicos intracelulares métodos tales como la utilización de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), detección espectrofotométrica, resonancia de espín electrónico (ESR) o espectroscopia de absorción atómica, como se ha descrito, por ejemplo, en Gower et al., *Anal. Biochem.* 1989, 180, 126-130). Ollinger and Roberg, *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 23707-23711). Flatmark y Tangeras, *Proteins of Iron Metabolism*, Brown, Aisen, Fielding, y Crichton, eds. (New York, EE.UU.: Grune y Stratton), 1976, pp. 349-358; Kozlov et al., *Free Radic. Biol. Med.* 1992, 13, 9-16). Cammack y Cooper, *Methods Enzymol.* 1993, 227, 353-384. Yegorov et al., *Free Radic. Biol. Med.* 1993, 15, 565-574). Cairo et al., *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 700-703). y Nielsen et al., *Int. J. Biochem.* 1993, 25, 223-232.

La capacidad quelante de metales de los compuestos de Fórmula I en un entorno celular se puede evaluar indirectamente mediante la evaluación del crecimiento celular, cambios en la expresión de los genes asociados con la regulación de metales, citotoxicidad, ensayos enzimáticos, u otros criterios de valoración mensurables que son conocidos en la técnica, en presencia del compuesto candidato y variando las concentraciones de los iones metálicos. Por ejemplo, la capacidad de quelación de metales de los compuestos de Fórmula I se puede evaluar en células cultivadas o en animales enteros mediante la manipulación de conjuntos de metales celular y la medición de cambios en el crecimiento celular en presencia y ausencia del compuesto candidato.

Alternativamente, o además de medir los cambios en el crecimiento celular, los cambios en la expresión génica de los genes regulados por metales o proteínas reguladoras de metales, tales como metalotioneína, o el factor de transcripción 1 de metales puede determinarse utilizando protocolos estándar conocidos en la técnica. Como se conoce en la técnica, la expresión de proteínas metalotioneína (MT) está estrechamente regulada por las concentraciones intracelulares de cinc. La unión del cinc al factor de transcripción de metales (MTF-1) permite que la MTF-1 se una a los elementos de respuesta a metal (MRE) en el promotor de MT, que a su vez inicia la transcripción del gen de la MT. Por consiguiente, la capacidad de los compuestos de Fórmula I para modular la expresión de MT o MTF-1 puede determinarse como una indicación de la capacidad de quelantes de metales de los compuestos. Otros genes regulados por metales conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, los genes que codifican las proteínas reguladoras de hierro (IRP), ferritina, o receptor de la transferrina, que están regulados por los niveles de hierro (véase, por ejemplo, Eisenstein y Blemings, *J. Nutr.* 1998, 128(12):2295-2295; y Martini et al., *J. Nutr.* 2002, 132(4):693-696; y el gen que codifica la proteína transportadora de cinc 1, que están regulada por los niveles de cinc (véase, por ejemplo, Kindermann et al., *J. Nutr.* 2004, 134(1):57-62; y Langmade et al., *J. Biol. Chem.* 2000, 275(44):34803-24809).

55 B. Estudios *in vitro*

i) Inhibición de la proliferación de células cancerosas

Los compuestos candidatos de Fórmula I se pueden ensayar inicialmente *in vitro* para determinar su capacidad para inhibir la proliferación de las células de cáncer utilizando técnicas estándar.

En general, la capacidad de un compuesto candidato de Fórmula I para inhibir la proliferación de las células cancerosas puede analizarse del siguiente modo. Las células de una línea celular de cáncer de ensayo específica se cultivan a una densidad adecuada (por ejemplo, aproximadamente 1×10^4) y se añaden varias concentraciones del compuesto candidato. Después de un tiempo de incubación apropiado (típicamente entre aproximadamente 48 a 74 horas), la supervivencia celular se evalúa, por ejemplo, mediante el ensayo de la escisión de la sal de tetrazolio (o la

sal de tetrazolio modificada) o mediante el uso de la prueba de reducción de resazurina (véase Fields y Lancaster (1993) Am. Biotechnol. Lab. 11:48-50; O'Brien et al., (2000) Eur J. Biochem. 267:5421-5426 y la patente de EE.UU. N° 5.501.959), el ensayo de sulforodamina (Rubinstein et al., (1990) J. Natl. Cancer Inst. 82:113 -118), el ensayo con colorante rojo neutro (Kitano et al., (1991) Euro. J. Clin. Investg. 21:53-58; West et al., (1992) J. Investigative Derm. 99:95-100) o el ensayo de XTT. La inhibición de la proliferación celular se determina por comparación de la supervivencia celular en el cultivo tratado con la supervivencia celular en uno o más cultivos control, por ejemplo, los cultivos no tratados previamente con el compuesto candidato, los pre-tratados con un vehículo control y / o los pre-tratados con un compuesto control (típicamente un terapéutico conocido).

Otros ensayos conocidos en la técnica que miden la actividad metabólica (por ejemplo, ensayos basados en tetrazolio) también se pueden usar para evaluar el efecto de los compuestos candidatos sobre la proliferación celular, dado que las células en proliferación tienden a ser metabólicamente más activas que las células en reposo.

Los compuestos candidatos también pueden analizarse *in vitro* para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento independiente de anclaje de las células tumorales. En la técnica se sabe que el crecimiento independiente de anclaje es un buen indicador de la tumorigenicidad. En general, el crecimiento independiente de anclaje se evalúa mediante siembra de las células de una línea celular de cáncer adecuada en agar blando y la determinación del número de colonias formadas después de un periodo de incubación apropiado. El crecimiento de las células tratadas con el compuesto candidato puede compararse con el de las células tratadas con un control apropiado (tal como se ha descrito anteriormente).

Una amplia variedad de líneas celulares de cáncer adecuadas para el ensayo de los compuestos de fórmula I están disponibles comercialmente, por ejemplo en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Manassas, VA) suministra en la actualidad más de 700 líneas celulares de cáncer humano y el Depósito de tumores DCTD (NCI en Frederick, MD) suministra una variedad de líneas celulares de mamíferos, incluyendo las líneas celulares de cáncer humano utilizadas en el cribado del NCI / NIH.

Ejemplos de líneas de células de cáncer humano adecuadas contra las que se pueden analizar los compuestos de Fórmula I incluyen, entre otras, las líneas celulares de cáncer de vejiga HT-1376, HT-1197, y Hs 195.T; adenocarcinoma de y carcinoma colon y colorrectal tales como CaCo, COLO320, HCT-116 LoVo, NCI-H498, NCI-H548 y SNU-C2B; la línea celular de cáncer duodenal HuTu 80; las líneas celulares de adenocarcinoma y carcinoma gástrico Hs 740.T, AGS, Hs 746T, NCI-N87, NCI- SNU-1 and RF-48; líneas celulares de cáncer de pulmón macrocítico NCI-H661 y NCI-H1581; líneas celulares de adenocarcinoma y carcinoma de próstata MDA PCa 2b, LNCaP-FGC y 22Rv1; líneas celulares de linfoma de Burkitt (no Hodgkin), líneas celulares Raji, Namalwa y HS Sultan; línea celular de linfoma histiocítico U-937; línea celular de la leucemia linfoblástica aguda (LLA-T) de células Jurkat, , línea celular de linfoma de células T Karpas 299; línea celular de leucemia de células plasmáticas L-363; y líneas celulares de adenocarcinoma y carcinoma rectal NCI-H630 y SW837. Las líneas celulares de cáncer resistentes a los medicamentos también pueden usarse para determinar la capacidad de los compuestos de la presente invención para inhibir el crecimiento y / o proliferación de células neoplásicas resistentes a un fármaco o a múltiples fármacos.

La selectividad neoplásica diferencial de los compuestos candidatos de fórmula I también se puede analizar, es decir la capacidad del compuesto para demostrar un cierto nivel de acción selectiva hacia las células neoplásicas (o cáncer) en comparación con las células normales en proliferación. Un método ejemplar de la evaluación de la sensibilidad diferencial entre las células normales y de cáncer para un compuesto lo ha descrito Vassilev et al. (Anti-Cancer Drug Design (2001) 16:7). Este método implica la comparación de los valores de CI_{90} , es decir la concentración molar de un compuesto de ensayo requerida para causar un 90% de inhibición del crecimiento de células de crecimiento exponencial. Por tanto, Por lo tanto, los valores de CI_{90} , para los compuestos candidatos pueden evaluarse en varias líneas celulares de cáncer (tales como las descritos anteriormente) y las células normales (tales como las células HUVEC y / o WI38) y se compararon. Los valores de CI_{90} se pueden medir utilizando una variedad de técnicas estándar como se conocen en la técnica. La selectividad de las células cancerosas se calcula como una relación entre el promedio de la CI_{90} para todas las líneas celulares normales y el promedio de CI_{90} para todas las líneas celulares de cáncer. Los compuestos con una relación de CI_{90} (normal / cáncer) de > 4 se consideran selectivos para las células cancerosas (L.T. Vassilev et al., Anti-cancer Drug Design, 2001, 16: 7-17).

En una realización de la presente invención, los compuestos de Fórmula I inhiben selectivamente la proliferación de una o más de las células de leucemia, células de cáncer de próstata, células de cáncer de pulmón macrocítico y células de cáncer de colon. La selectividad de los compuestos candidatos se evalúa utilizando líneas celulares de cáncer humano utilizados en el Programa de Medicamentos del NCI / NIH Terapéutico *in vitro*. Las líneas de células de cáncer que se usan en este cribado se muestran en la Tabla 1 ant.

De acuerdo con esta forma de realización de la presente invención, un compuesto muestra inhibición selectiva de un cáncer seleccionado (es decir, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón macrocítico y / o leucemia) cuando el compuesto inhibe la proliferación de las líneas celulares del cáncer seleccionado con un promedio del GI_{50} al menos un 10% más bajo que el promedio de GI_{50} para la inhibición de las líneas celulares de cada uno de cáncer de mama, cáncer del SNC, melanoma, cáncer de ovarios y cáncer renal. En una realización, el GI_{50} promedio para las células del cáncer de próstata, células de cáncer de colon, células de cáncer de pulmón macrocítico y / o células de

leucemia es al menos un 15% más bajo que el promedio del GI_{50} para la inhibición de las líneas celulares de cada uno de cáncer de mama, cáncer del SNC, melanoma, cáncer de ovarios y cáncer renal. En otra realización, el GI_{50} promedio para las células del cáncer de próstata, células de cáncer de colon, células de cáncer de pulmón macrocítico y / o células de leucemia es al menos un 20% más bajo que el promedio del GI_{50} para la inhibición de las líneas celulares de cada uno de cáncer de mama, cáncer del SNC, melanoma, cáncer de ovarios y cáncer renal.

Métodos para calcular el GI_{50} son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Boyd, M. R., et al. En *Cytotoxic Anticancer Drugs: Models and Concepts for Drug Discovery and Development*; Vliote, F. A.; Corbett, T. H.; Baker, L. H., Eds.; Kluwer Academic: Hingham, MA, 1992 y Monks, A.; et al. (1991) *JNCI, J. Natl. Cancer Inst.* 83, 757-766). pp 11-34). Como se describe en la técnica, el GI_{50} es un cambio de nombre del valor de la CI_{50} (la concentración que provoca la inhibición del crecimiento del 50%) que hace hincapié en la corrección en el cálculo del GI_{50} para el recuento de células en el tiempo cero. Por tanto, el GI_{50} es la concentración de un compuesto candidato, donde

$$100 \times (T - T_0)/(C - T_0) = 50.$$

y en la que: la densidad óptica del ensayo después de un período de 48 h de exposición al fármaco de ensayo es T, la densidad óptica a tiempo cero es T_0 , y la densidad óptica control es C.

Por ejemplo, la siguiente metodología, que emplea actualmente el NCI, se puede utilizar para evaluar el GI_{50} de un compuesto candidato de Fórmula I en las líneas celulares de cáncer seleccionadas. Brevemente, las suspensiones de células se diluyen (5000-40.000 células por pocillo) y 100 μ l de la suspensión celular diluida se añaden a placas de microtitulación de 96 pocillos. A los inoculados se les permite un período de preincubación de 24 horas a 37 °C para su estabilización. Las diluciones al doble de la concentración de ensayo prevista del compuesto candidato se añaden a tiempo cero en alícuotas de 100 μ l a los pocillos de la placa de microtitulación. Los compuestos de ensayo generalmente se evalúan a cinco diluciones de 10 veces. En las pruebas de rutina, la concentración más alta de pocillo normalmente es $10E-4$ M, pero se puede ajustar dependiendo del compuesto se esté analizando. Las células se incuban con el compuesto de ensayo durante 48 horas en atmósfera del 5% de CO_2 y una humedad del 100%. Las células se analizan después usando el ensayo de sulforrodamina B (véase, por ejemplo, Skehan, P., et al. (1990) *JNCI, J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107-1112). y Chen, S. F., et al. (1990) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 31, A2644) usando un lector de placas que puede usarse para leer las densidades ópticas.

ii) Capacidad para aumentar la expresión de genes supresores tumorales reguladas por metales de transición

De acuerdo con una realización de la presente invención, los compuestos de fórmula I aumentan la expresión de un gen supresor tumoral regulado por metales de transición en células de cáncer. En otra realización, los compuestos de Fórmula I aumentan la expresión del gen supresor de tumores en células de cáncer en el que la expresión del gen supresor de tumores está regulada por disminución. La expresión aumentada o regulada por aumento de un gen supresor de tumores regulado por metales de transición en células de cáncer se puede determinar como un porcentaje del aumento en la expresión del gen en las células tratadas en comparación con las células no tratadas. En una realización, los compuestos de Fórmula I aumentan la expresión de un gen supresor tumoral regulado por metales de transición en aproximadamente un 10%. En otra realización, los compuestos de Fórmula I aumentan la expresión de un gen supresor tumoral regulado por metales de transición en aproximadamente un 20%. En otras realizaciones, los compuestos de Fórmula I aumentan la expresión de un gen supresor tumoral regulado por metales de transición en aproximadamente un 25%, 50%, 75% o 100%.

El aumento o la regulación por aumento de la expresión de un gen supresor de tumores regulado por metales de transición en células de cáncer también se puede determinar como una "multiplicación" o regulación por aumento de la expresión del gen en las células cancerosas, en el que la expresión de genes en las células cancerosas no tratadas se presenta como "1" y la respectiva "multiplicación" en la expresión génica en las células cancerosas tratadas se presenta con relación a la respectiva expresión génica en las células cancerosas no tratadas. En una realización de la presente invención, los compuestos de Fórmula I pueden aumentar o regular por aumento la expresión de un gen supresor tumoral regulado por metales de transición en aproximadamente 1,5 veces. En otra realización, los compuestos de Fórmula I pueden aumentar la expresión de un gen supresor tumoral regulado por metales de transición en aproximadamente 2,0 veces.

En otra realización de la invención, el gen supresor de tumores regulado por metales de transición es *KLF4*. La capacidad de los compuestos candidatos para modular la expresión de los genes supresores de tumores, tales como *KLF-4*, se puede evaluar midiendo los cambios en los niveles de ARNm o proteína de *KLF4*. Métodos de la realización de estos ensayos se conocen en la técnica.

Por ejemplo, el compuesto candidato se puede introducir en una línea celular de cáncer seleccionada y la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen supresor de tumor de interés se puede medir por técnicas estándar tales como análisis de transferencia de tipo Northern, RT-PCR, y similares. Alternativamente, la cantidad de proteína supresora de tumores producida por la célula se puede medir mediante técnicas estándar tales como análisis de transferencia de tipo Western. La cantidad de ARNm o proteína producida en una célula tratada con el compuesto candidato puede compararse a continuación con la cantidad producida en las células control y proporcionarán una indicación de cómo el

compuesto ha inhibido la expresión del gen supresor de tumores con éxito. Las células de control adecuadas incluyen, por ejemplo, células no tratadas y / o células tratadas con un compuesto de control.

Alternativamente, los compuestos candidatos pueden cribarse según su capacidad de aumentar la expresión génica en una línea celular de cáncer seleccionada usando métodos estándar para la expresión de múltiples genes de selección ("perfil de expresión"). Tales métodos son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, análisis en micromatriz: tales como ensayos de micromatrices de alta densidad que contienen 10 veces más (por ejemplo, 119.000) genes humanos para identificar grupos funcionales adecuados de los genes cuya expresión se ve afectada por el compuesto.

Por lo general, el perfil de expresión hace uso de micromatrices prefabricadas de secuencias cortas de ADN u oligonucleótidos. Métodos de construcción de micromatrices se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc, NY. (1y actualizaciones)). Como alternativa, las micromatrices pueden ser adaptadas por ejemplo, para incluir secuencias correspondientes a genes supresores de tumores conocidos. Las micromatrices prefabricadas también están disponibles comercialmente para muchos organismos, incluyendo, por ejemplo, GeneChip® (Affimetrix, Santa Clara, CA), Atlas™ (BD Biosciences-CLONTECH, Palo Alto, CA), GEM Microarrays, GeneJet™ array y LifeSeq® (Incyte Genomics, Palo Alto, CA), MICROMAX™ Human cDNA Microarray Systems (PerkinElmer Life Sciences, Boston, Mass.) y ResGen™ GeneFilters® (Invitrogen, Huntsville, Ala.). Para el análisis de la expresión, se aísla el ARN de las células tratadas con el compuesto candidato y a partir de las células control. En caso necesario el ARN se puede amplificar mediante técnicas convencionales para asegurar una cantidad suficiente para el análisis. El ARN se hibrida después con la micromatriz en condiciones adecuadas y se realiza un análisis de rutina de la micromatriz por los escáneres disponibles en el mercado y el software para identificar los genes cuya expresión está alterada en las células tratadas con respecto a las células de control. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones de hibridación adecuadas usando técnicas estándar. Después de la identificación de dichos otros genes, la cuantificación del ARNm y los respectivos niveles de proteína también se pueden evaluar para determinar la medida del efecto del compuesto sobre los genes objeto de la investigación.

iii) Inducción de la apoptosis

De acuerdo con otra forma de realización de la presente invención, los compuestos de fórmula I son capaces de inducir apoptosis en células cancerosas. Métodos de evaluación de la capacidad de los compuestos candidatos para inducir apoptosis son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Cell Biology*, (2000 y actualizaciones, K. Morgan, ed., J. Wiley & Sons, Nueva York, NY) e incluyen, por ejemplo, análisis de la fragmentación del ADN, citometría de flujo en combinación con la tinción de anexina con V-FITC y yoduro de propidio, marcaje con fluorocromo de las roturas de la cadena de ADN mediante la desoxinucleotidil transferasa terminal (ensayo TdT) y análisis por citometría de flujo, detección por citometría de flujo o detección in situ con inmunocitoquímica utilizando ensayo de marcaje en muesca terminal con dUTP mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (TUNEL), detección con inmunohistoquímica o citometría de flujo de escisión proteolítica o proteólisis de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), y / o detección de la activación de las cisteinil - proteasas de ácido aspártico (caspasas).

Por ejemplo, el efecto de los compuestos de Fórmula I sobre la apoptosis puede evaluarse mediante la incubación de las células con el compuesto candidato durante un período de tiempo, seguido de análisis de citometría utilizando el método de anexinaV-FITC-yoduro de propidio. La entrada en la apoptosis conduce a la translocación de la fosfatidilserina desde la cara interna hacia el lado extracelular de la membrana plasmática. La anexina V, una proteína que se une con alta afinidad a la fosfatidilserina, se puede utilizar para detectar esta alteración de la membrana inducida por apoptosis. El colorante de unión a ADN, yoduro de propidio (PI), entra fácilmente y tiñe las células no viables, pero no puede atravesar la membrana de las células viables. Por lo tanto, las células que se tiñen con anexina V sólo se consideran en la apoptosis temprana, mientras que las células teñidas con tanto con anexina V y PI se considera que están en apoptosis tardía. Las células teñidas con PI sólo se consideran no viables, mientras que la ausencia de tinción indica células viables.

Los ensayos para investigar los posibles mecanismos de acción de los compuestos se pueden realizar si se desea con el fin de proporcionar información útil para determinar qué aspectos del crecimiento de tumores afectan a los compuestos. Este tipo de información puede ayudar a determinar los tipos de cáncer que se beneficiarán del tratamiento con los compuestos. Ejemplos de dichos ensayos incluyen, entre otros, análisis del ciclo celular (por ejemplo, empleando técnicas de citometría de flujo), ensayos anti-angiogénesis (por ejemplo, varios ensayos de Matrigel, incluyendo ensayos de formación del cordón Matrigel y el análisis inmunohistoquímico.

C. Ensayo *in vivo*

La capacidad de los compuestos candidatos para inhibir el crecimiento tumoral, la proliferación y / o la metástasis *in vivo* se puede determinarse en un modelo animal apropiado utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Enna, et al. *Current Protocols in Pharmacology*, J. Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY). Exemplary protocols are provided below and in the Examples.

Por ejemplo, la actividad in vivo de los compuestos candidatos también se puede probar usando el ensayo de la fibra hueca (Hollingshead, M., et al. (1995) Life Sciences 57:131-141; y Decker et al., Eur. J. of Cancer 40: 821-826 (2004)). En este ensayo, las células que crecen en fibras huecas (fluoruro de polivinilideno, PVDF), se implantan en diversos compartimentos del cuerpo de los ratones. Un panel estándar de 12 líneas de células tumorales puede usarse para el cribado en fibra hueca de compuestos candidatos que han presentado actividad *in vitro*. Estas líneas celulares pueden incluir NCI-H23, NCI-H522 MDA-MB-231, MDA-MB-435 SW-620 COLO 205 LOX-IMVI, UACC-62 OVCAR-3 OVCAR-5 U251 y SF-295. Además, se pueden utilizar líneas alternativas, tales como las descritas en la sección *in vitro* anterior, para pruebas especializadas de compuestos. Las líneas celulares se cultivan de acuerdo con protocolos estándar, las fibras se preparan mediante el lavado las células en las fibras de PVDF y sellado de ellos a intervalos de 2 cm. Las muestras generadas a partir de estos sellos se colocan en medio de cultivo de tejidos y se incubaron a 37 °C en 5% de CO₂ durante de 24 a 48 horas antes de la implantación. Un total de 3 líneas tumorales diferentes se preparan para cada experimento de manera que cada ratón recibe 3 implantes inhaperitoneales (1 de cada línea tumoral) y 3 implantes subcutáneos (1 de cada línea tumoral). El día de la implantación, las muestras de cada preparación de línea de células tumorales se cuantifican para la masa de células viables mediante, por ejemplo, un ensayo MTT de punto final estable, de modo que se conoce el tiempo de la masa de células cero. Los ratones se tratan con agentes experimentales a partir del día 3 o 4 después de la implantación de la fibra y continuando diariamente durante 4 días. Cada agente se administra por inyección intraperitoneal a 2 niveles de dosis. Las fibras se recogen de los ratones en el día siguiente del cuatro tratamiento con el compuesto y se sometieron a ensayo MTT de punto final estable. La densidad óptica de cada muestra se determinó espectrofotométricamente a 540 nm y se calcula la media de cada grupo de tratamiento. El crecimiento neto por ciento para cada línea celular en cada grupo de tratamiento se calcula y se compara con el crecimiento neto por ciento en los controles tratados con vehículo. Una reducción del 50% o superior en el porcentaje del crecimiento neto en las muestras tratadas en comparación con las muestras de control de vehículo se considera un resultado positivo Cada resultado positivo se le da una puntuación de 2 y todas las puntuaciones se suman para un compuesto dado. La puntuación máxima posible para un agente es 96 (12 líneas celulares X 2 X 2 sitios niveles de dosis X 2 [puntuación])

Un compuesto candidato que somete inicialmente a detección selectiva en el ensayo de fibra hueca puede analizarse después en un modelo de xenotrasplante si tiene una puntuación combinada i.p. + s.c. de 20 o mayor, una puntuación s.c. de 8 o mayor, o produce la muerte de células de cualquier línea celular a cualquier nivel de dosis evaluado. Este sistema de puntuación ha sido validado por los estadísticos DCTDC en CTEP para que represente un nivel de detección previsto para los agentes actuales "estándar" como activos.

Alternativamente, los compuestos de Fórmula I se pueden probar directamente en modelos de xenoinjertos. Los modelos de xenoinjerto, en los que un tumor humano se ha implantado en un animal, son un modelo estándar en el que evaluar la actividad anticancerosa de un compuesto candidato. Ejemplos de modelos de xenoinjerto de cáncer humano incluyen entre otros, xenoinjertos de tumores sólidos humanos implantados mediante inyección subcutánea o implantación y utilizados en ensayos de crecimiento de tumor; isoinjertos de tumores sólidos humanos implantados mediante inyección almohadilla de grasa y usados en ensayos de crecimiento del tumor; xenoinjertos de tumores humanos sólidos ortotópicos, implantados directamente en el tejido relevante y utilizados en ensayos de crecimiento tumoral; modelos de enfermedad diseminada para los tumores sólidos o leucemias, a través de inyección intravenosa, utilizado en ensayos de supervivencia; modelos experimentales de linfoma y leucemia en ratones, utilizados en ensayos de supervivencia; y modelos experimentales de metástasis pulmonar en ratones. Además de las células de tumores humanos implantados, los modelos de xenoinjerto pueden comprender además leucocitos de sangre periférica humanos trasplantados, que permiten la evaluación de la respuesta inmunológica contra el cáncer. En diversos modelos de xenoinjerto, las células de tumores humanos implantados o trasplantados pueden ser células tumorales primarias o células tumorales derivadas de una línea celular.

Existen varias opciones animal huésped para los modelos de xenoinjerto, que incluyen, entre otros, el uso de ratones inmunodeficientes combinados graves (SCID), ratones desnudos atímicos, ratas atímicas. Los ratones no obesos diabéticos / inmunodeficientes graves combinados (NOD / SCID) representan otro animal huésped que se puede utilizar en diversos modelos de trasplante de xenoinjerto, por ejemplo, para el injerto de las células de cáncer hematológicas, tales como células de leucemia y / o de linfoma.

Alternativamente, murine cancer models can be used for screening anti-tumour compounds. Ejemplos de modelos de cáncer murino apropiados se conocen en la técnica e incluyen, entre otros, modelos de implantación en los que las células cancerosas murinas se implantan mediante inyección intravenosa, subcutánea, en la almohadilla de grasa u ortotópica; modelos de metástasis murina; modelos de ratones transgénicos y los modelos de ratones defectivos. The effect of the candidate compound can also be assessed on spontaneous tumours in normal mice.

Por ejemplo, los compuestos candidatos pueden analizarse in vivo en tumores sólidos utilizando ratones a los que se haya injertados subcutáneamente o inyectado de 30 a 60 mg de un fragmento de tumor, o un número apropiado de células tumorales (por ejemplo, aproximadamente de 10⁶ a 10⁷) el día 0. Los animales portadores de tumores se mezclan antes de ser sometidos a los diversos tratamientos y controles. En el caso del tratamiento de tumores avanzados, se permite el desarrollo de los tumores hasta el tamaño deseado, eliminándose a los animales con tumores desarrollados insuficientemente. Los animales elegidos se distribuyen aleatoriamente para someterlos a los tratamientos y controles. Los animales no portadores de tumores también pueden ser sometidos a los mismos

tratamientos que los animales portadores de tumores para poder disociar el efecto tóxico del efecto específico sobre el tumor. La quimioterapia generalmente comienza entre 3 y 22 días después del injerto, dependiendo del tipo de tumor, y los animales se observan cada día. Los compuestos candidatos pueden administrarse a los animales, por ejemplo, mediante infusión en bolo. Los diferentes grupos de animales se pesan cerca de 3 o 4 veces a la semana hasta que se alcance la máxima pérdida de peso, después de lo cual los grupos se pesan por lo menos una vez a la semana hasta el final del ensayo.

Los tumores se miden aproximadamente 2 o 3 veces a la semana hasta que el tumor alcanza un tamaño y / o peso predeterminado, o hasta que haya transcurrido un período de tiempo predeterminado, o hasta que el animal muere (si esto ocurre antes de que llegue al tumor del tamaño / peso predeterminado). Los animales se sacrifican a continuación y se evalúa la histología de tejido, el tamaño y / o la proliferación del tumor.

El efecto de los compuestos candidatos sobre tumores resistentes a los fármacos puede evaluarse in vivo mediante la utilización de una célula de cáncer resistente a uno o a varios fármacos en los experimentos de xenoinjertos.

Para el estudio del efecto de los compuestos candidatos en los tumores hematológicos, tales como linfomas o leucemias, se injerta o inyecta en los animales un número particular de células, y la actividad antitumoral se determina por el aumento del tiempo de supervivencia de los ratones tratados respecto a los controles. La evaluación de la carga de enfermedad en modelos de xenoinjerto de leucemia también se puede realizar mediante la medición de varios indicadores de la leucemia, tales como marcadores de superficie celular o la expresión de genes específicos de leucemia, usando citometría de flujo o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de sangre en serie.

Para el estudio del efecto de los compuestos candidatos en la metástasis celular, las células tumorales se tratan típicamente con el compuesto ex vivo y luego se inyecta en un animal de ensayo adecuado. La propagación de las células tumorales desde el sitio de inyección se monitoriza a continuación, durante un período de tiempo adecuado.

La capacidad de los compuestos candidatos para actuar en combinación con, o para sensibilizar a un tumor a los de, otro agente quimioterapéutico también puede analizarse en los modelos anteriores. En este caso, los animales de ensayo se tratarían tanto con el agente quimioterapéutico como con el compuesto candidato de Fórmula I. Los animales control podrían incluir animales tratados con el agente quimioterapéuticos solos, animales tratados con el compuesto candidato solo y / o animales no tratados.

Los efectos tóxicos in vivo de los compuestos de Fórmula I pueden evaluarse mediante técnicas estándar, por ejemplo, mediante la medición de su efecto sobre el peso corporal de los animales durante el tratamiento y mediante la realización de perfiles hematológicos y análisis de enzimas hepáticas después de que el animal ha sido sacrificado (ensayos de supervivencia).

Tabla 2: Ejemplos de modelos *in vivo* de cáncer humano

MODELO DE CÁNCER	TIPO DE CÉLULA
Ensayo de crecimiento tumoral	Próstata (PC-3, DU145)
Xenoinjertos de tumores sólidos humanos en ratones (inyección subcutánea)	Mama (MDA-MB-231, MVB-9) Colon (HT-29)
	Pulmón (NCI-H460, NCI-H209) De páncreas (ASPC-1, SU86.86) De páncreas: resistente a fármacos (BxPC-3) De piel (A2058, C8161) Cervical (SIHA, HeLa-S3) Cervical: resistente a fármacos (HeLa resistente a S3-HU) De hígado (HepG2) De cerebro (U87-MG) Renal (Caki-1, A498) De ovarios (SK-OV-3) De vejiga urinaria (T24)
Ensayo de crecimiento tumoral isoinjertos de tumores sólidos humanos en ratones (inyección en la almohadilla de grasa)	De mama resistente a fármacos (MDA-CDDP-S4, MDA-MB435-To.1)
Ensayo de supervivencia Modelo experimental de linfoma y leucemia en ratones	Humano: Linfoma de Burkitt (no Hodgkin) (Raji, Namalwa, HS Sultan), linfoma histiocítico (U-937), leucemia mielógena crónica (K-562), leucemia linfoblástica aguda (LLA-T) (Jurkat, CEM, MOLT-4), linfoma de linfocitos T (Karpas 299), leucemia de células plasmáticas (L-363) Murino: eritroleucemia (inducida por retrovirus de CB7 Friend), leucemia linfocítica (L1210), linfoma (P388)

MODELO DE CÁNCER	TIPO DE CÉLULA
Modelo experimental de metástasis pulmonar en ratones	Humano: melanoma (C8161). Murino: fibrosarcoma (R3)

Además, si se desea, el efecto del compuesto de Fórmula I sobre el nivel de expresión de un gen supresor de tumores regulado por metales de transición se puede evaluar en el tumor de los animales de ensayo midiendo, por ejemplo, los cambios en los niveles de ARNm o proteicos del supresor tumoral. Métodos de la realización de estos ensayos se conocen en la técnica como se ha descrito anteriormente.

Si se desea, una o más pruebas de inmunohistoquímica estándar también pueden llevarse a cabo en tejidos aislados de los animales de ensayo con el fin de determinar los efectos del compuesto sobre el crecimiento, diferenciación, apoptosis y/o angiogénesis. Ejemplos de dichos ensayos incluyen, entre otros, el uso de anticuerpos específicos (por ejemplo, anticuerpos contra Ki-67 para evaluar la proliferación, CD31 para evaluar la angiogénesis, NK1.1 como una indicación de la presencia de células NK, F4/80 como una indicación de la presencia de macrófagos) y los ensayos de TUNEL para determinar la apoptosis.

D. Ensayos de toxicidad

Los compuestos de Fórmula I también se pueden someter a ensayos de toxicidad si se desea. Los ensayos de toxicidad de los medicamentos potenciales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hayes, A.W., ed., (1994), Principles and Methods of Toxicology, 3^a ed., Raven Press, NY. Maines, M., ed., Current Protocols in Toxicology, John Wiley & Sons, Inc., NY).

Los ensayos de toxicidad de un compuesto de fórmula I se pueden realizar usando líneas de células de mamífero (véase, por ejemplo, Ekwall, B., Ann. N.Y. Acad. Sci., (1983) 407:64-77). La selección de una línea celular apropiada es dependiente de la aplicación potencial del compuesto candidato y la puede determinar fácilmente un experto en la técnica. Por ejemplo, estos ensayos incluyen el tratamiento de fibroblastos primarios humanos *in vitro* con los compuestos de Fórmula I en la presencia de un vehículo comercial. Las células se analizan en diferentes puntos de tiempo después del tratamiento para determinar su viabilidad usando un ensayo de viabilidad estándar, tales como el ensayo de exclusión con azul tripán, ensayos XTT o MTT. Las células también pueden analizarse para determinar su capacidad para sintetizar ADN, por ejemplo, usando un ensayo de incorporación de timidina, y para cambios en la dinámica del ciclo celular, por ejemplo, utilizando un ensayo estándar de clasificación de células en combinación con un clasificador de células fluorocitómetro (FACS).

Los ensayos de toxicidad *in vivo* se pueden realizar por metodología estándar, por ejemplo, mediante la inyección de concentraciones variables del compuesto candidato en un modelo animal apropiado. El compuesto puede inyectarse una vez, o la administración puede repetirse durante varios días. Los efectos tóxicos del compuesto se pueden evaluar durante un período de tiempo apropiado monitorizando la mortalidad, cambios en el comportamiento, aspecto, y el peso corporal de los animales. Después de la finalización del período de evaluación, los animales se pueden sacrificar y determinar el aspecto y el peso de los órganos relevantes. En caso necesario se pueden realizar evaluaciones adicionales de, por ejemplo, los perfiles hematológicos, la histología, y análisis de enzimas hepáticas. También se puede obtener una indicación de la toxicidad de un compuesto durante los ensayos *in vivo* del compuesto.

La genotoxicidad de los compuestos de Fórmula I se puede evaluar *in vitro*, en caso necesario, utilizando técnicas estándar, tales como el ensayo de Ames o el cribado de la actividad mutagénica. el ensayo de linfoma de ratón para determinar la capacidad de un artículo de ensayo para inducir la mutación de genes en una línea celular de mamífero, ensayos *in vitro* de aberración cromosómica utilizando, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) para determinar cualquier reordenamiento del ADN o daños inducidos por el artículo de ensayo. Otros ensayos incluyen el ensayo de cromátidas hermanas, que determina cualquier intercambio entre los brazos de un cromosoma inducido por el artículo de ensayo y ensayos *in vitro* de micronúcleos de ratón para determinar cualquier daño a los cromosomas o al huso mitótico. La genotoxicidad de los compuestos de Fórmula I también puede evaluarse *in vivo*, si es necesario, utilizando el ensayo de intercambio de cromátidas hermanas, *in vivo*, *ensayo de micronúcleos in vivo*, o el ensayo de aberración cromosómica *in vivo*. Los protocolos para estos y otros ensayos convencionales son conocidos en la técnica, por ejemplo, véase OECD Guidelines for the Testing of Chemicals and protocols developed by the ISO.

IV. Usos de los Compuestos de Fórmula I

Los compuestos de fórmula I se pueden usar para tratar, estabilizar o prevenir el cáncer en un sujeto. En este contexto, los compuestos pueden ejercer un efecto citotóxico o citostático que resulta en una reducción del tamaño de un tumor, la ralentización o la prevención de un aumento en el tamaño de un tumor, un aumento en el tiempo de supervivencia libre de enfermedad entre la desaparición o la eliminación de un tumor y su reaparición, la prevención de una ocurrencia inicial o posterior de un tumor (por ejemplo metástasis), un aumento en el tiempo hasta la progresión, la reducción de uno o más de los síntomas adversos asociados con un tumor, o un aumento en el tiempo de supervivencia global de un sujeto que tiene cáncer. De acuerdo con una realización de la presente invención, los compuestos de Fórmula I ejercen un efecto citotóxico sobre las células cancerosas a través de la inducción de la apoptosis en las células cancerosas.

Ejemplos de tumores incluyen, entre otros, neoplasias hematológicas, incluyendo leucemias mielomas y linfomas; carcinomas, incluyendo adenocarcinomas y carcinomas de células escamosas; melanomas y sarcomas. carcinomas y sarcomas también se denominan con frecuencia "tumores sólidos." Ejemplos de tumores sólidos habituales incluyen entre otros, cáncer de cerebro, de mama cuello de útero, colon, de cabeza y cuello, de riñón, pulmón, de ovario, páncreas, próstata, de estómago y de útero, cáncer de pulmón macrocítico y cáncer colorrectal. Varias formas de linfoma también pueden resultar en la formación de un tumor sólido y, por tanto, también se consideran a menudo tumores sólidos.

Una realización de la presente invención proporciona compuestos de la Fórmula I para uso en el tratamiento de uno o más de cáncer de próstata, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de colon y leucemia. Además, De acuerdo con una realización de la presente invención, los compuestos de fórmula I se pueden utilizar en el tratamiento de un cáncer para aumentar la expresión de un gen supresor regulado por metales de transición en células cancerosas. En una realización específica, los compuestos de fórmula I se pueden usar para tratar, estabilizar o prevenir un cáncer en el que el gen supresor tumoral regulado por metales *KLF4* funciona como un supresor de tumores, incluyendo cánceres del tracto gastrointestinal (GI), cáncer de vejiga y leucemia. Los cánceres del tracto gastrointestinal (estómago) incluyen cánceres esofágicos, cánceres de intestino delgado, cánceres de duodeno, cánceres de colon; cánceres colorrectales, cánceres rectales y cánceres anales.

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I para uso para aumentar la expresión de un gen supresor tumoral regulado por metales de transición en células de cáncer. En otra realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para uso para aumentar la expresión del gen supresor tumoral *KLF4*.

Los cánceres que pueden tratarse de acuerdo con una realización de la presente invención, por lo tanto, incluyen, entre otros, leucemias; adenocarcinomas y carcinomas, incluyendo los carcinomas de células escamosas. Los carcinomas también se denominan con frecuencia "tumores sólidos", como se ha descrito anteriormente. y ejemplos de tumores sólidos habituales que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen, entre otros, cáncer anal, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de duodeno, cáncer gástrico (de estómago), cáncer de pulmón (macroscítico), cáncer de esófago, cáncer de próstata, cáncer rectal y cáncer de intestino delgado. De acuerdo con lo anterior, una realización de la presente invención proporciona el uso de compuestos de fórmula I en el tratamiento de un cáncer seleccionado de entre el grupo de leucemia, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (macroscítico), cáncer de próstata y un cáncer de la tracto GI, en el que los cánceres del tracto GI incluyen, entre otros, cáncer anal, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de duodeno, cáncer gástrico (de estómago), cáncer esofágico, cáncer rectal y cáncer de intestino delgado.

El término "leucemia" se refiere, en términos generales, a las enfermedades malignas progresivas de los órganos que forman la sangre. La leucemia se caracteriza típicamente por una proliferación y desarrollo distorsionados de los leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea, pero también puede referirse a enfermedades malignas de otras células de la sangre tales como eritroleucemia, que afecta a los glóbulos rojos inmaduros. La leucemia se clasifica generalmente clínicamente sobre la base de (1) la duración y el carácter de la enfermedad, aguda o crónica; (2) el tipo de célula implicada - mielóide (mielógena), linfóide (linfógena), o monocítica, y (3) el aumento o la falta de aumento en el número de células anormales en la sangre leucémica o aleucémica (subleucémica). La leucemia incluye, por ejemplo, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia de células T adultas, leucemia aleucémica, leucemia aleucocitémica, leucemia basófila, leucemia de blastocitos, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutis, leucemia embrionaria, leucemia eosinofílica, leucemia de Gross leucemia de células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfóide, leucemia de células linfosarcoma, leucemia mastocítica, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia granulocítica mielóide, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmacítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica, y leucemia de células indiferenciadas.

El término "carcinoma" se refiere a un nuevo crecimiento maligno compuesto de células epiteliales que tienden a infiltrarse en los tejidos circundantes y dan lugar a metástasis. El término "carcinoma" abarca también los adenocarcinomas. Los adenocarcinomas son carcinomas que se originan en las células que hacen que los órganos que tienen propiedades glandulares (de secreción) o que se originan en las células que revisten las vísceras huecas, tales como el tracto gastrointestinal o el epitelio bronquial,, e incluyen los adenocarcinomas de pulmón y de próstata.

De acuerdo con la presente invención, los compuestos de acuerdo con la Fórmula I se pueden utilizar para tratar varias etapas y grados del desarrollo y progresión de las células de cáncer, tumor y / o el cáncer. La presente invención, por tanto, contempla las combinaciones para su uso en el tratamiento de cánceres en fase inicial, incluyendo principios de neoplasias que pueden ser pequeñas, de crecimiento lento, localizadas y / o no agresivas, por ejemplo, con la intención de curar la enfermedad o provocar la regresión de la cáncer, así como en el tratamiento de la fase intermedia y en el tratamiento de los cánceres en etapa tardía, incluyendo neoplasias avanzadas y/o metastásicas y/o agresivas, por ejemplo, para retardar la progresión de la enfermedad, para reducir la metástasis o para aumentar la supervivencia

del paciente. De un modo similar, las combinaciones se pueden usar en el tratamiento de cánceres de bajo grado, cánceres de grado intermedio y de alto grado.

5 La presente invención también contempla que los compuestos se pueden utilizar en el tratamiento de cánceres indolentes, cánceres recurrentes, incluidos los cánceres localmente recurrentes, recurrentes a distancia y / o refractarios (es decir, cánceres que no han respondido al tratamiento), cánceres metastásicos, cánceres localmente avanzados y cáncer agresivos. Por tanto, un cáncer "avanzado" incluye el cáncer localmente avanzado y cáncer metastásico y se refiere a la enfermedad manifiesta en un paciente, en el que dicha enfermedad manifiesta no es susceptible de curarse mediante las modalidades locales de tratamiento, como la cirugía o la radioterapia. El término "cáncer metastásico" se refiere al cáncer que se ha diseminado de una parte del cuerpo a otra. Los cánceres avanzados también pueden ser resecables, es decir, que se han diseminado a los tejidos circundantes y no pueden ser extirpados quirúrgicamente.

15 Un experto en la técnica apreciará que muchas de estas categorías pueden superponerse, por ejemplo, cánceres agresivos son típicamente también metastásico. "El cáncer agresivo", como se usa en el presente documento, se refiere a un cáncer de rápido crecimiento. Un experto en la técnica apreciará que algunos cánceres, como el cáncer de mama o cáncer de próstata, el término "cáncer agresivo" se referirán a un cáncer avanzado que ha recurrido en aproximadamente los dos tercios anteriores de la gama de tiempos de recaída para un determinado cáncer. mientras que para otros tipos de cáncer, como el carcinoma de pulmón de células pequeñas (CPCP) casi todos los casos presentes en rápido crecimiento cánceres que se consideran agresivos. Por tanto, el término puede cubrir una subsección de un cierto tipo de cáncer o puede abarcar todos los demás tipos de cáncer.

20 Los compuestos también pueden usarse para tratar cánceres resistentes a fármacos, incluyendo tumores resistentes a múltiples fármacos. Como se conoce en la técnica, la resistencia de las células cancerosas a la quimioterapia es uno de los problemas centrales en el tratamiento del cáncer.

25 Ciertos tipos de cáncer, como el de próstata, pueden tratarse mediante la terapia hormonal, es decir, con hormonas o medicamentos antihormonales que retrasan o detienen el crecimiento de ciertos tipos de cáncer al bloquear las hormonas naturales del cuerpo. Estos cánceres pueden desarrollar resistencia, o ser intrínsecamente resistentes, a la terapia hormonal. La presente invención contempla además el uso de los compuestos en el tratamiento de tales cánceres o "resistentes a hormonas" o "refractarios a hormonas".

30 La presente invención también contempla los compuestos como "agentes sensibilizantes," que inhiben selectivamente el crecimiento de células cancerosas. En este caso, el compuesto por sí solo no tiene un efecto citotóxico sobre la célula de cáncer, pero proporciona un medio de debilitar las células cancerosas, y facilitar mejor el beneficio obtenido de la aplicación de agentes terapéuticos contra el cáncer convencionales, o para potenciar de otra manera dicha terapéutica.

35 Por tanto, la presente invención contempla la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos junto con uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer. El compuesto (s) se puede administrar antes, durante o después del tratamiento con el agente terapéutico contra el cáncer. Un "agente terapéutico contra el cáncer" es un compuesto, composición o tratamiento que previene o retrasa el crecimiento y / o metástasis de las células cancerosas. Tales agentes terapéuticos contra el cáncer incluyen, entre otros, tratamiento con fármacos quimioterapéuticos, radiación, terapia génica, manipulación hormonal, inmunoterapia y terapia con oligonucleótido antisentido. Ejemplos de fármacos quimioterapéuticos útiles incluyen entre otros, hidroxurea, busulfán, cisplatino, carboplatino, clorambucilo, melfalano, ciclofosfamida ifosfamida danorubicina, doxorubicina, epirubicina, mitoxantrona, vincristina, vinblastina, Navelbine® (vinorelbina), etopósido, tenipósido, paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, citosina, arabinósido, bleomicina, neocarzinostatina, suramin, taxol, mitomicina C y similares. Los compuestos de la invención también son adecuados para su uso con terapias de combinación estándar empleando dos o más agentes quimioterapéuticos. Debe entenderse que la terapéutica anticáncer para uso en la presente invención también incluye nuevos compuestos o tratamientos desarrollados en el futuro.

40 Los compuestos de Fórmula I también son adecuados para su uso en una variedad de aplicaciones en las que se desea la quelación de un metal de transición, por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas. La quelación de metales es relevante para el tratamiento de la intoxicación por metales, toxicidad de metales, exceso de metales exceso en el cuerpo, tales como sobrecarga de hierro asociada con trastornos genéticos y / o anemias dependientes de transfusión, infección por un microorganismo, enfermedades o trastornos mediados por el sistema inmunológico, enfermedades o trastornos de la piel, enfermedades o trastornos neurológicos, enfermedades o trastornos cardiovasculares, enfermedades o trastornos relacionados con el envejecimiento, o enfermedades o trastornos genéticos. En una realización de la presente invención, los compuestos de fórmula I se pueden usar en aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, para quelar iones metálicos *in vivo*, para el tratamiento de enfermedades o trastornos distintos de cáncer.

45 Los compuestos de Fórmula I también se pueden usar en productos o procesos en los que se desea la quelación de un metal de transición, por ejemplo, para prevenir o controlar el escalado, la degradación química, la decoloración, la precipitación el crecimiento microbiano la inestabilidad de la emulsión la característica de rancios y/u otros problemas

asociados con iones metálicos indeseados, tales como malos olores, malos sabores, turbidez, pérdida de claridad, deterioro de la textura, formación de cristales, cambios de viscosidad, la oxidación. El uso de quelantes en estas situaciones puede ayudar a mejorar la calidad del producto, el atractivo para el consumidor, la vida útil o de valor, mejorar la eficiencia de procesamiento, disminuir el tiempo muerto del equipo, reducir los costos de procesamiento. Por tanto, la presente invención contempla el uso de los compuestos de Fórmula I para la quelación de iones metálicos en diversas aplicaciones, incluyendo, entre otras, productos alimenticios y bebidas, productos de limpieza, productos de cuidado personal, productos farmacéuticos, aplicaciones de diagnóstico, aplicaciones de pulpa y papel, aplicaciones de tratamiento de aguas aplicaciones metalúrgicas, aplicaciones textiles, productos y aplicaciones agrícolas, aplicaciones de procesamiento de caucho, aplicaciones de la fotografía, tinta de impresión, aplicaciones de campos petroleros aplicaciones de minería, endulzamiento de gas, aplicaciones de construcción, aplicaciones electrónicas eliminación y prevención de incrustaciones.

V. Composiciones Farmacéuticas

Los compuestos de la presente invención se formulan típicamente antes de la administración. La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de fórmula I y un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente, o excipiente. Las composiciones farmacéuticas se preparan mediante procedimientos conocidos usando ingredientes bien conocidos y fácilmente disponibles. Las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de Fórmula I en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos conocidos contra el cáncer también se contemplan en la presente invención.

Los compuestos de la fórmula general I o composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos se pueden administrar por vía oral, tópica, parenteral mediante inhalación o pulverización o rectal en formulaciones monodosis que contienen vehículos adyuvantes y transportadores no tóxicos farmacéuticamente aceptables convencionales. En el curso habitual de la terapia, el compuesto activo se incorpora en un vehículo aceptable para formar una composición para administración tópica en el área afectada, tales como cremas o lociones hidrófobas o hidrófilas, o en una forma adecuada para administración oral, rectal o parenteral, tales como jarabes, elixires, comprimidos, trociscos, pastillas, cápsulas duras o blandas, píldoras, supositorios, suspensiones oleosas o acuosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, inyectables, o soluciones. El término parenteral, como se usa en el presente documento, incluye inyecciones subcutáneas, intradérmicas, intraarticulares, intravenosas intramusculares, intravasculares, intraesternales, intratecales o técnicas de infusión.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los compuestos de fórmula I y un vehículo, tal como una vesícula de membrana artificial (que incluye un liposoma micelas de lípidos y similares), micropartículas o microcápsulas.

Las composiciones destinadas para uso oral se pueden preparar en formas de dosificación en unidades sólidas o fluidas. La forma de dosificación de unidades fluidas se pueden preparar de acuerdo con cualquier procedimiento conocido en la técnica para fabricar composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes de conservación con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente aceptables y agradables al gusto. Un elixir se prepara usando un vehículo hidroalcohólico (etanol) con edulcorantes adecuados, tales como azúcar y sacarina, junto con un agente aromático saborizante. Las suspensiones se pueden preparar con un vehículo acuoso con la ayuda de un agente de suspensión, tal como goma arábiga, goma tragacanto, metilcelulosa y similares.

Las formulaciones sólidas, tales como comprimidos, contienen el ingrediente activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos, que son adecuados para fabricar comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, fosfato cálcico y fosfato sódico: agentes de granulación y disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido alginico.: agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o goma arábiga, y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio ácido esteárico o talco, y otros ingredientes convencionales tales como fosfato dicálcico, silicato de magnesio aluminio, sulfato de calcio, almidón, lactosa, metilcelulosa, y materiales funcionalmente similares. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden recubrirse mediante técnicas que se conoce que retrasan la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y, de este modo, proporcionan una acción sostenida durante un periodo de tiempo largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retraso de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las formulaciones de uso oral se pueden presentar como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuètes, parafina líquida o aceite de oliva. Las cápsulas de gelatina blanda se preparan mediante encapsulación en máquina de una suspensión espesa del compuesto con un aceite vegetal aceptable, vaselina líquida ligera u otro aceite inerte.

Las suspensiones acuosas contienen materiales activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosa. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga.; agentes de dispersión o humectación pueden ser una fosfatida natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilen-oxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitan,. Las suspensiones acuosas pueden también contener uno o más conservantes, por ejemplo etilo, o n-propilo, p-hidroxibenzoato uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas se pueden formular mediante suspensión de los ingredientes activos en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuets, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes, tales como los que se han indicado anteriormente y agentes edulcorantes y para proporcionar preparaciones orales agradables al gusto. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo en mezcla con un agente de dispersión o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Ejemplos de agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión son como los que ya se han mencionado en lo que antecede. También pueden estar presentes excipientes por ejemplo agentes edulcorantes, aromatizantes y conservantes adicionales.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden también estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o mezclas de éstos. Agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas naturales, por ejemplo goma arábiga o goma tragacanto, fosfatidas naturales, por ejemplo soja, lecitina, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos hexitol, anhídridos, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitan, ay productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitan. Las emulsiones puede también contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una solución acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo en forma de una solución en 1,3-butanodiol Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, Rsolución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles, en forma de un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite fijo suave incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, aceites grasos tales como ácido oleico en la preparación de sustancias inyectables. También se pueden incluir en la solución o suspensión inyectable adyuvantes, tales como anestésicos locales conservantes y agentes tampón.

El o los compuestos de la fórmula general I se pueden administrar, juntos o por separado, en forma de supositorios para administración rectal del fármaco. Estas composiciones se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a las temperaturas habituales pero líquido a la temperatura rectal y que por lo tanto se funda en el recto liberando el fármaco. Dichos materiales incluyen manteca de cacao y polietilenglicoles.

Otras composiciones farmacéuticas y procedimientos para preparar las composiciones farmacéuticas son bien conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (formerly "Remingtons Pharmaceutical Sciences"); Gennaro, A.; Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2000).

VI. Administración de compuestos de fórmula I

Los compuestos de fórmula I se pueden administrar a un sujeto mediante varias vías dependiendo del cáncer que se va a tratar, por ejemplo, Los compuestos se pueden administrar por vía oral, tópica, parenteral mediante inhalación o pulverización o por vía rectal en formulaciones de unidades de dosificación. En una realización, los compuestos se administran sistémicamente a un sujeto, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión en la corriente sanguínea de un sujeto o mediante administración oral. Cuando se usa junto con uno o más agentes quimioterapéuticos conocidos, los compuestos se pueden administrar antes, o después, de la administración de los agentes quimioterapéuticos, o se pueden administrar de forma concomitante. El uno o más agentes quimioterapéuticos pueden también administrarse sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección en bolo, infusión, o administración oral.

Los compuestos de fórmula I se pueden usar como parte de una terapia neoadyuvante (a terapia primaria) o como parte de un régimen terapéutico adyuvante. La presente invención contempla el uso de los compuestos de fórmula I en

varias etapas en el desarrollo y progresión del tumor, incluyendo en el tratamiento de neoplasias avanzadas y/o agresivas (es decir, enfermedad franca en un sujeto que no es apto para curar mediante las modalidades de tratamiento locales, tales como la cirugía o la radioterapia), enfermedad metastásica, enfermedad localmente avanzada y/o tumores resistentes (es decir, un cáncer o tumor que no ha respondido al tratamiento).

"La terapia primaria" se refiere a una primera línea de tratamiento tras el diagnóstico inicial de cáncer en un sujeto. Terapias primarias de ejemplo pueden implicar cirugía, una amplia gama de quimioterapias y radioterapia. La "terapia adyuvante" se refiere a una terapia que sigue a un tratamiento primario y que se administra a sujetos en riesgo de recaída. La terapia sistémica adyuvante generalmente se inicia poco después de la terapia primaria para retrasar la recurrencia, prolongar la supervivencia o curar un sujeto.

Se contempla que los compuestos de la invención se pueden usar solos o en combinación con uno o más de otros agentes quimioterapéuticos como parte de una terapia primaria o una terapia adyuvante. Las combinaciones de los compuestos de Fórmula I y quimioterapéuticos estándar pueden actuar para mejorar la eficacia de la quimioterapia y, por tanto, se pueden utilizar para mejorar las terapias estándar contra el cáncer. Esta aplicación puede ser importante en el tratamiento de cánceres resistentes a los medicamentos que no responden al tratamiento estándar. Los cánceres resistentes a los medicamentos pueden surgir, por ejemplo, de la heterogeneidad de las poblaciones de células tumorales, las alteraciones en la respuesta a la quimioterapia y un aumento de potencial maligno. Tales cambios son a menudo más pronunciados en las etapas avanzadas de la enfermedad.

La dosis que se va a administrar no está sujeta a límites definidos, pero normalmente será una cantidad eficaz. Por lo general, será el equivalente, en una base molar de la forma libre farmacológicamente activa producida a partir de una formulación de dosificación tras la liberación metabólica del fármaco libre activo para lograr sus efectos farmacológicos y fisiológicos deseados. Las composiciones se pueden formular en una forma de dosificación unitaria. El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado. Ejemplos de intervalos para el compuesto (s) en cada unidad de dosificación son de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 100 mg, o más generalmente, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 50 mg.

Las dosificaciones al día de los compuestos de la presente invención normalmente entrarán dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, en dosis única o dividida. Sin embargo, se entenderá que la cantidad real del compuesto (s) para administrar la determinará un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección a tratar, la ruta de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, el peso, y la respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente. El intervalo de dosificación anterior se proporciona únicamente con fines ilustrativos y no está destinado a limitar el alcance de la invención de ninguna manera. En algunos casos los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo mencionado anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos dosis aún mayores se pueden emplear sin causar efectos secundarios perjudiciales, por ejemplo, dividiendo primero la dosis grande en varias dosis más pequeñas para la administración durante todo el día.

VII. Ensayos clínicos en pacientes con cáncer

Un experto en la técnica apreciará que tras la eficacia demostrada de un compuesto de fórmula I in vitro y en modelos animales, se puede someter a estudios convencionales+ de toxicología animal y farmacocinética según la BPC y, después, pasar a los Ensayos Clínicos con el fin de evaluar adicionalmente su eficacia en el tratamiento del cáncer y para obtener la autorización reguladora para el uso terapéutico. Como se conoce en la técnica, los ensayos clínicos progresan a través de fases de las pruebas que se identifican como las Fases I, II, III, y IV.

Inicialmente, el compuesto seleccionado de fórmula I se evaluará en un ensayo de Fase I, que suele ser un ensayo abierto. Típicamente se utilizan ensayos de fase I para determinar el mejor modo de administración (por ejemplo, en comprimidos o por inyección), la frecuencia de administración, y la toxicidad para el compuesto. Los estudios de fase I con frecuencia incluyen ensayos de laboratorio, como análisis de sangre y biopsias, para evaluar los efectos del compuesto de Fórmula I en el cuerpo del paciente. Para un ensayo de Fase I, un pequeño grupo de pacientes con cáncer son tratados con una dosis específica del compuesto de Fórmula I. Durante el ensayo, la dosis se aumenta típicamente grupo por grupo con el fin de determinar la dosis máxima tolerada (DMT) y las toxicidades limitantes de la dosis (DLT) asociadas con el compuesto. Este proceso determina una dosis apropiada para utilizar en un ensayo posterior de Fase II.

Un ensayo de fase II puede llevarse a cabo para evaluar la eficacia y seguridad de los compuestos de acuerdo con la presente invención. En los ensayos de fase II, estos compuestos se administran a grupos de pacientes, ya sea con un tipo específico de cáncer o con cánceres asociados, utilizando la dosis que se ha encontrado que es eficaz en los ensayos de fase I.

Los ensayos de fase III se centran en la determinación de cómo un compuesto se compara con el tratamiento habitual, o más ampliamente aceptado. En los ensayos de fase III, los pacientes son asignados al azar a uno de dos o más

"ramas". En un ensayo con dos ramas, por ejemplo, una rama recibirá el tratamiento estándar (grupo de control) y la otra rama recibirán tratamiento con un compuesto de acuerdo con la presente invención (grupo de investigación).

5 Los ensayos de fase IV se utilizan para evaluar aún más la seguridad a largo plazo y la eficacia de un compuesto. Los ensayos de fase IV son menos comunes que los de fase I, II y III de los ensayos y se llevarán a cabo después de que el compuesto se haya aprobado para su uso estándar.

A. Elegibilidad de los pacientes para los ensayos clínicos

10 Los criterios de elegibilidad del participante pueden ir de lo general (por ejemplo, edad sexo, tipo de cáncer) a específicos (por ejemplo, el tipo y número de tratamientos previos, las características del tumor, los recuentos de células sanguíneas, la función del órgano) Los criterios de elegibilidad pueden variar también con la fase de ensayo. Por ejemplo, En los ensayos de fase I y II, los criterios a menudo excluyen a los pacientes que podrían estar en riesgo por el tratamiento de investigación debido a una función orgánica anormal u otros factores. En los ensayos de Fase II y III a menudo se incluyen criterios adicionales respecto al tipo de enfermedad y el estadio, , y el número y tipo de tratamientos anteriores.

20 Los ensayos de cáncer de Fase I por lo general comprenden de 15 a 30 participantes para quienes otros tratamientos no han sido eficaces. Los ensayos de fase II típicamente comprenden hasta 100 participantes que ya han recibido quimioterapia, cirugía, o tratamiento de radiación, pero para quienes el tratamiento no ha sido efectivo. La participación en ensayos de fase II se limita a menudo en base al tratamiento previo recibido. Los ensayos de fase III por lo general comprenden cientos de miles de participantes. Este gran número de participantes es necesario con el fin de determinar si existen verdaderas diferencias entre la eficacia de los compuestos de acuerdo con la presente invención y el tratamiento estándar. La fase III puede comprender pacientes que van desde los recién diagnosticados con cáncer a aquellos con enfermedad extensa con el fin de cubrir el continuo de la enfermedad.

30 Un experto en la técnica apreciará que los ensayos clínicos deben diseñarse para que sean lo más inclusivo posible sin hacer que la población de estudio sea demasiado diversa para determinar si el tratamiento podría ser tan eficaz en una población definida más estrictamente, .Cuanto más diversa sea la población incluida en el ensayo, más aplicables pueden ser los resultados a la población general, especialmente en los ensayos de fase III. La selección de participantes apropiados en cada fase de ensayo clínico se considera dentro de las habilidades normales de un experto en la técnica.

B. Evaluación de los pacientes antes del tratamiento

35 Antes del comienzo del estudio, se pueden usar varias medidas conocidas en la técnica para clasificar primero los pacientes., por ejemplo, utilizando la escala del estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (PS).ECOG PS . ECOG PS es un estándar ampliamente aceptado para la evaluación de la progresión de la enfermedad de un paciente medida por el deterioro funcional en el paciente, en la que ECOG PS 0 indica que no hay deterioro funcional, ECOG PS 1 y 2 indican que los pacientes tienen cada vez un mayor deterioro funcional, pero siguen siendo ambulatorios y ECOG PS 3 y 4 indican la incapacidad progresiva y la falta de movilidad.

45 La calidad de vida general de los pacientes se puede evaluar, por ejemplo, utilizando la escala McGill Quality of Life Questionnaire (MQOL) (Cohen et al (1995) Palliative Medicine 9: 207-219). El MQOL mide los síntomas físicos; el bienestar psicológico y existencial; el soporte; y la calidad de vida en general. Para evaluar los síntomas tales como náuseas, el estado de ánimo, el apetito, el insomnio la movilidad y la fatiga de la se puede usar la Symptom Distress Scale (SDS) (SDS), desarrollada por McCorkle y Young ((1978) Cancer Nursing 1: 373-378) .

50 Los pacientes también pueden clasificarse de acuerdo con el tipo y / o de la etapa de su enfermedad y / o por el tamaño del tumor.

C. Control Farmacocinético

55 Para cumplir con los criterios de la Fase I, la distribución del compuesto se controla, por ejemplo, mediante el análisis químico de las muestras, como la sangre o en la orina, recogidos a intervalos regulares. Por ejemplo, se pueden tomar muestras a intervalos regulares hasta alrededor de 72 horas después del inicio de la infusión. En una realización, se toman muestras a 0, 0,33, 0,67, 1, 1,25, 1,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 horas después del inicio de cada infusión del compuesto.

60 Si el análisis no se lleva a cabo inmediatamente, las muestras se pueden colocar en hielo seco después de la recogida y transporte posterior a un congelador para almacenar a -70 °C hasta que el análisis pueda llevarse a cabo. Las muestras se pueden preparar para el análisis utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica y la cantidad de compuesto se puede determinar por ejemplo, por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC),

65 Los datos farmacocinéticos se pueden generar y analizar en colaboración con un farmacólogo clínico experto y se utilizan para determinar, por ejemplo, aclaramiento, la semivida y la concentración máxima en plasma.

D. Control de los resultados en los pacientes

El criterio de valoración de un ensayo clínico es un resultado medible que indica la eficacia de un compuesto en fase de evaluación. El criterio de valoración se estableció con anterioridad al inicio de la prueba y variará en función del tipo y la fase del ensayo clínico. Ejemplos de criterios de valoración incluyen, por ejemplo, tasa de respuesta tumoral - la proporción de los participantes del ensayo cuyo tumor se redujo en tamaño por una cantidad específica, normalmente descrita como un porcentaje; supervivencia libre de enfermedad - la cantidad de tiempo que un participante sobrevive sin cáncer ni recurrencia del mismo, se suele medir en meses; la supervivencia global - la cantidad de tiempo que un participante vive, por lo general se mide desde el inicio del ensayo clínico hasta el momento de la muerte. Para los cánceres avanzados y / o metastáticos, estabilización de la enfermedad - la proporción de los participantes del ensayo cuya enfermedad se ha estabilizado, por ejemplo, cuyo tumor (s) ha dejado de crecer y / o metastatizar, se pueden utilizar como criterio de valoración Otros criterios de valoración incluyen la toxicidad y la calidad de vida.

La tasa de respuesta tumoral es un criterio de valoración típico en los ensayos de fase II. Sin embargo, incluso si un tratamiento reduce el tamaño del tumor de un participante y alarga el período de supervivencia libre de enfermedad, puede no alargar la supervivencia global. En dicho caso, los efectos secundarios y la no extensión de la supervivencia global podrían superar el beneficio de la supervivencia libre de enfermedad. Alternativamente, la mejora de la calidad de los participantes de la vida durante el intervalo libre de tumor puede prevalecer sobre otros factores Por tanto, debido a que las tasas de respuesta tumoral a menudo son temporales y pueden no traducirse en beneficios para la supervivencia a largo plazo para el participante, la tasa de respuesta es una medida razonable de la efectividad de un tratamiento en un ensayo de fase II, mientras que la supervivencia de los participantes y la calidad de vida se utilizan normalmente como criterios de valoración en un ensayo de Fase III.

VIII. Kits

La presente invención proporciona adicionalmente kits farmacéuticos que comprenden uno o más compuestos de fórmula I. En una realización los kits terapéuticos son para uso en el tratamiento del cáncer. Los contenidos del kit se pueden liofilizar y el kit puede contener adicionalmente un disolvente adecuado para la reconstitución de los componentes liofilizados. Los componentes individuales del kit se envasan en recipientes separados y, asociados a dichos recipientes, puede haber una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación por el organismo de la fabricación, para su uso o venta para la administración humana o animal.

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una o más soluciones líquidas, la solución líquida puede ser una solución acuosa, por ejemplo una solución acuosa estéril. Para el uso *in vivo*, los compuestos se pueden formular en una composición con jeringa farmacéuticamente aceptable. En este caso, el recipiente pueden ser en sí mismo un inhalador, jeringa, pipeta, cuentagotas ocular, u otro aparato similar, a partir del cual la formulación se puede aplicar a un área infectada del sujeto, tales como los pulmones, se inyecta en un sujeto, o incluso aplicarse a y mezclarse con los otros componentes del kit.

Los kits o envases farmacéuticos que comprenden uno o más compuestos de la presente invención en combinación con uno o más quimioterapéuticos estándar para aplicaciones de terapia de combinación también se contemplan en la presente invención.

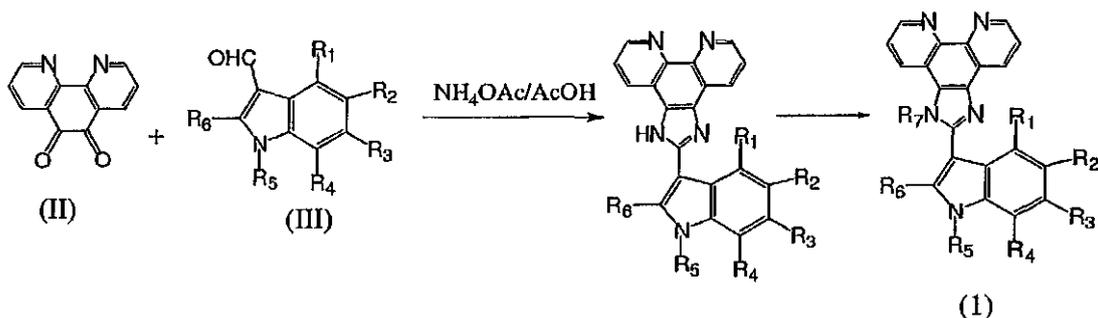
También se ha demostrado en el presente documento que los compuestos de Fórmula I son capaces de quelar iones de metales de transición. La presente invención proporciona adicionalmente kits que contienen uno o más compuestos de Fórmula I para la quelación de iones de metales de transición.

La invención se describirá a continuación con referencia a ejemplos específicos. Se entenderá que los siguientes ejemplos están destinados a describir realizaciones de la invención y no se pretende que limiten la invención en modo alguno.

Ejemplos

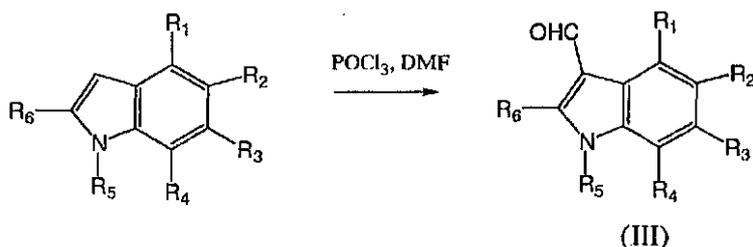
PREPARACIÓN DE COMPUESTOS:

Ejemplos de compuestos de fórmula (I) se han preparado de acuerdo con el esquema que se muestra a continuación:



5 En un procedimiento típico, 1 mmol (1 equiv.) de phenanthrolinequinone se sometió a reflujo con la cantidad equimolar del correspondiente aldehído y acetato de amonio 10 mmol (10 equiv.) en ácido acético glacial. El proceso de reacción se controló mediante TLC, hasta que se consiguió el consumo completo de los reactivos. Después de finalizada la reacción, la mezcla reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se diluyó en agua, las impurezas se extrajeron con diclorometano (DCM) a partir de la solución obtenida. La capa acuosa se basificó y el precipitado separado de la 2-indolilo imidazo [4,5-d] fenantrolina se filtró y se recrystalizó en un disolvente adecuado. Cuando sea necesario, la 2-indolil imidazo [4,5-d] fenantrolina, en la que R7 es H se trató con R7X para dar el compuesto (I), en la que R7 es distinto de H.

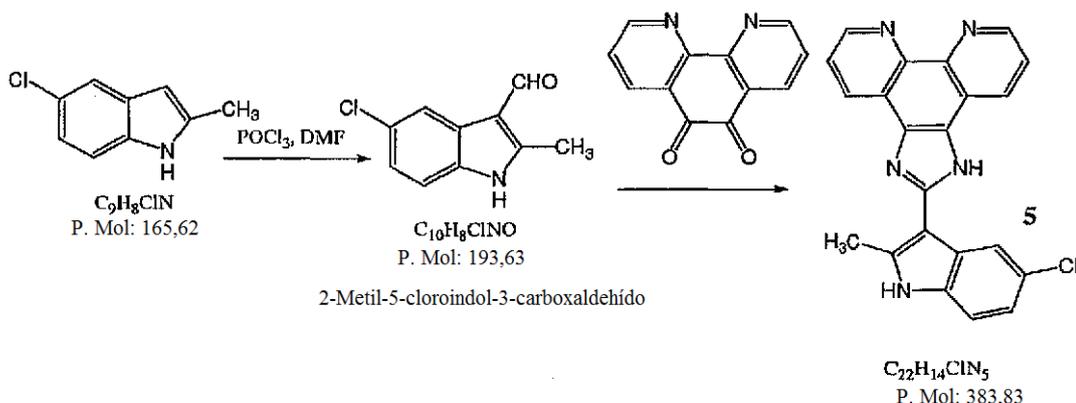
10 Indol-3-carboxaldehdos de fórmula (III) se prepararon de acuerdo con el siguiente esquema:



15 En un procedimiento experimental típico 11 mmol (1,1 equiv.) de POCl_3 se añadió gota a gota a la solución agitada magnéticamente del indol (10 mmol, 1,0 equiv.) en 15-20 ml de dimetilformamida (DMF) a 5-10 °C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas y a 60 °C durante 0,5 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se vertió sobre 100 g de hielo. La solución obtenida se basificó con NaHCO_3 a pH > 7, la mezcla se agitó a 60 °C durante 1 hora, el precipitado separado se filtró y se recrystalizó en un disolvente adecuado.

20 Los puntos de fusión se registraron usando un aparato de punto de fusión capilar MEL-TEMP, el punto de fusión está sin corregir. La RMN de ^1H se realizó en un instrumento Bruker de 500 MHz a temperatura ambiente usando un disolvente deuterado adecuado.

25 EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 5

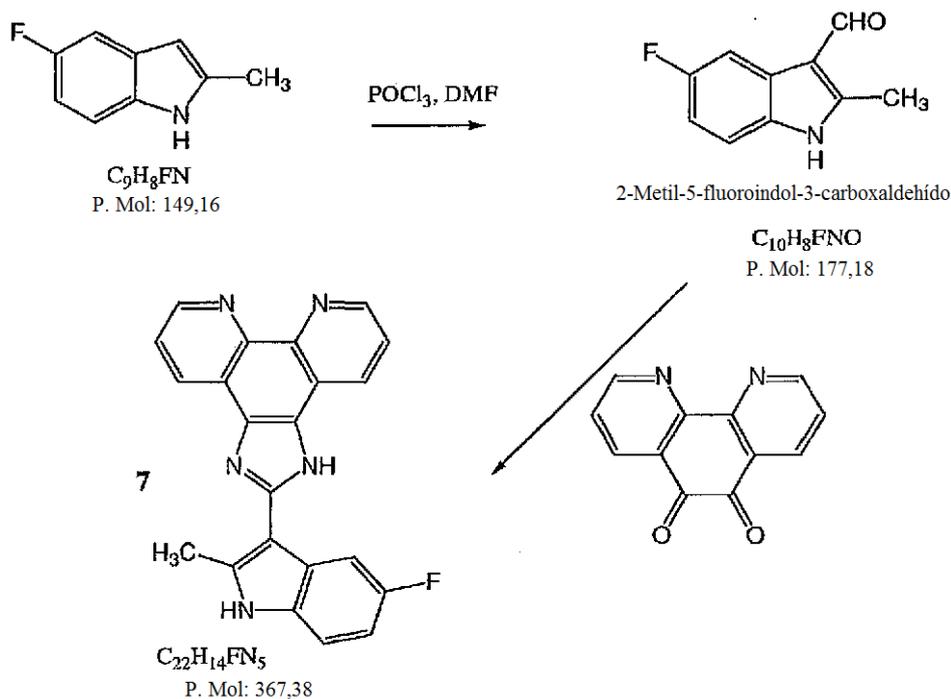


30 Se añadieron gota a gota 0,96 g de POCl_3 a una solución de 2-metil-5-cloroindol (1,0 g) en 20 ml de DMF, a 10 °C. La mezcla se agitó a 50 °C durante 1 hora, se enfrió y se diluyó con solución saturada de NaHCO_3 . La suspensión se

calentó a 60 °C durante 15 min, se enfrió, y se filtraron los precipitados de 2-metil-5-cloroindol-3-carboxaldehído. Rendimiento 1,14 g (99%). Una muestra analítica se cristalizó a partir de EtOH.

- 5 La mezcla de fenantroquinolina (0,210 g) y 5-cloroindol-3-carboxaldehído 2-metilo (0,203 g) se sometió a reflujo durante 1,5 horas en ácido acético (5 ml) en presencia de acetato de amonio (0,77 g). El precipitado separado de compuesto 5 se filtró, y se lavó con AcOH, EtOH+H₂O y EtOH+EtOAc. Rendimiento 0,230 g (60%).

EJEMPLO 2: PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 7



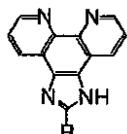
- 10 Se añadieron gota a gota 1,69 g de POCl₃ a la solución de 2-metil-5-fluoroindol (1,49 g) en 20 ml de DMF), a 10 °C. La mezcla se agitó a 50 °C durante 1 hora, se enfrió y se diluyó con solución saturada de NaHCO₃. La suspensión se calentó a 60 °C durante 15 min, se enfrió y se filtraron los precipitados de 2-metil-5-fluoro-indol-3-carboxaldehído. Rendimiento 1,14 g (99%).

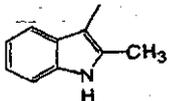
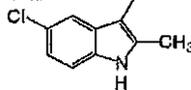
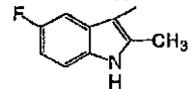
- 15 La mezcla de fenantroquinolina (0,210 g) y 2-metil-5-fluoro-indol-3-carboxaldehído (0,177 g) se sometió a reflujo durante 1,5 horas, en ácido acético (5 ml) en presencia de acetato de amonio (0,77 g), se vertió en 1% de HCl, se extrajo con DCM. La capa acuosa se basificó con Na₂CO₃, el precipitado de compuesto 7 se filtró y se cristalizó a partir de EtOH. Rendimiento 0,19 g (52%) del producto puro.

EJEMPLO 3: ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA IN VITRO DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE COLON HT-29

- 25 La capacidad de los compuestos de Fórmula I para inhibir la proliferación de células humanas de carcinoma de colon HT-29 se analizó del siguiente modo. Las células HT-29 de carcinoma de colon utilizadas en este ejemplo y los ejemplos posteriores se mantuvieron como una monocapa en un medio de crecimiento; Medio de McCoy's 5A modificado (Sigma, St. Louis, MO), suplementado con L-glutamina 2 mM (Gibco, Grand Island, NY), 10% de suero bovino fetal (FBS) (Multicell, WISENT Inc. St-Bruno, QC), antibiótico-antimicótico (Multicell), a 37 °C en un incubador humidificado con 5% de CO₂. Las células se transfirieron a placas de cultivo tisular de 150 mm y se cultivaron hasta sub-confluencia (70-80%) antes de su uso. La actividad antiproliferativa *in vitro* de los compuestos se evaluó mediante incubación de las células con concentraciones variables de los compuestos como se muestra en la Tabla 1 durante 6-7 días. La eficacia de estos compuestos en este ensayo de proliferación celular se midió en base a la capacidad de las células vivas para reducir la sal de tetrazolio XTT en compuestos de color naranja de formarán (kit de proliferación celular XTT II, Roche Applied Science, Montreal, QC), Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Actividad antiproliferativa de los compuestos de Fórmula I



Compuesto	R	Cl ₅₀ (μM)
3*		0,6
5		0,35
7		0,7

(*no forma parte de la invención)

5 EJEMPLO 4: EFECTO DE METALES EXÓGENOS SOBRE LA CAPACIDAD DE LOS COMPUESTOS 5 Y 7 PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON HT29 *IN VITRO*

Para determinar la capacidad de los compuestos 5 y 7 para quelar metales en células se añadieron metales exógenos a las células HT-29 de forma simultánea con varias concentraciones de los compuestos 5 y 7. Brevemente, las células HT-29 se trataron con varias concentraciones de los compuestos 5 y 7, más o menos cobre (CuSO₄·5H₂O 25 μM) o cinc (100 μM de ZnCl₂), durante 5 días. La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo XTT. Los efectos del cobre y el cinc sobre la inhibición del crecimiento de las células HT-29 se muestran en la Figura 6A para el compuesto 5 y en la Figure 6B para el compuesto 7. De un modo similar al compuesto 3, el cinc alteró las actividades inhibitoras del crecimiento de los compuestos 5 y 7, mientras que el cobre alteró la actividad únicamente a concentraciones bajas de los compuestos 5 y 7. Los resultados indican que los compuestos 5 y 7 funcionan como quelantes de cinc y de cobre y la presencia en exceso de estos metales bloquea los efectos inhibitorios del crecimiento de los compuestos 5 y 7.

20 EJEMPLO 5: EFICACIA *IN VIVO* DEL COMPUESTO 3 (VÉASE LA TABLA 3) EN UN MODELO DE XENOINJERTO DE CARCINOMA DE COLON

La capacidad del compuesto 3 para inhibir el crecimiento del tumor de colon *in vivo* se analizó del siguiente modo. A ratones hembra CD-1 atímicas (7 ratones por grupo de tratamiento, 6-7 semanas) se les inyectó por vía intraperitoneal células de adenocarcinoma de colon humano HT-29 células (3 x 10⁶ células en 0,1 ml de PBS). El tratamiento de los ratones con vehículo o 50 mg / kg / día de compuesto 3 se inició 5 días después de la inoculación (tamaño de los tumores = 20-40 mm³) para los ciclos de 7-Día de los cinco días, seguido de un descanso de 2 días durante 5 semanas. El tamaño de los tumores se midió en el transcurso del experimento usando compás, y el peso de los tumores se midió después de sacrificar a los animales. El compuesto 3 fue capaz de inhibir el crecimiento tal como se mide por el tamaño del tumor y el peso, en comparación con animales de control tratados con vehículo (véase la Figura 13A y 13B)

30 EJEMPLO 6: EFICACIA *IN VIVO* DEL COMPUESTO 3 EN UN MODELO DE XENOINJERTO DE CARCINOMA DE PULMÓN MACROCÍTICO

La capacidad de los compuestos de Fórmula I para inhibir el crecimiento del tumor de pulmón de células grandes *in vivo* se analizó mediante la determinación de la eficacia del compuesto 3 en un modelo de xenoinjerto tal como se describe a continuación. El compuesto 3 se analizó como una formulación a base de lípidos que tiene la siguiente composición: diestearoilfosfatidilethanolamina-polietilenglicol (DSPE-PEG / 5% en moles) y fosfatidilcolina de huevo (EPC / 95% mol). La formulación se preparó como sigue: soluciones madre del compuesto 3 y lípidos (EPC y DSPE-PEG) se prepararon en DMF. Volúmenes específicos de las soluciones madre de compuesto 3 y lípido se mezclaron a continuación con el fin de lograr una concentración final de lípidos de 25 mg / ml (EPC: DSPE-PEG = 95:5 (mol %)) y una proporción entre el compuesto 3 y los lípidos totales de 1:10 (p/p). La mezcla se agitó durante cuatro horas. se secó a fondo en nitrógeno y se dejó durante la noche bajo vacío. Después se añadió solución salina con tampón HEPES (HBS 0,01 M, pH=7,4) calentado hasta 60°C con el fin de rehidratar la película seca. Las soluciones se agitaron con vórtex, se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente y se sonicaron durante dos horas y media. La formulación se centrifugó después a 1000 rpm durante 5 minutos para eliminar cualquier compuesto libre 3.

45 Ratones CD-1 hembra atímicas (6-7 semanas de edad, 7 ratones por grupo de tratamiento) se inyectó por vía intraperitoneal células NCI-H460i de pulmón humano (3 x 110⁶ células en 0,1 ml de PBS) por vía subcutánea. El tratamiento de los ratones con vehículo o compuesto 3 se inició 5 días después de la inoculación (tamaño de los

tumores = 20-40 mm³) para los ciclos de 7 días de cinco días, seguido de un descanso de 2 días durante toda la duración del experimento (35 días). Se trató a los ratones con 80 mg / kg / día durante la primera semana, seguido de 40 mg / kg / día hasta el final del experimento. El tamaño de los tumores se midió en el transcurso del experimento usando compás, y el peso de los tumores se midió después de sacrificar a los animales. El compuesto 3 fue capaz de inhibir el crecimiento del tumor de pulmón de células grandes, tal como se mide por el tamaño del tumor y el peso, en comparación con animales de control tratados con vehículo (véase la Figura 14A y 14B)

EJEMPLO 7: EFICACIA *IN VIVO* DEL COMPUESTO 3 5, Y 7 EN UN MODELO DE XENOINJERTO DE CARCINOMA DE COLON.

La capacidad de los compuestos 3, 5, y 7 para inhibir el crecimiento de células de carcinoma de colon *in vivo* se analizó en el modelo de xenoinjerto de ratón como se describe en el Ejemplo 5. Los compuestos se analizaron como formulaciones Lutrol (administrado por vía i.p.), formulaciones de micelas a base de lípidos (administradas por vía i.v.), o formulaciones a base de agua (administradas por vía ip). Los controles del vehículo incluyen control de Lutrol (ip administrado ip), e control con micelas lipídicas (administradas i.v.), , el control con agua (administrada ip). Las formulaciones de Lutrol contenían 15% de Lutrol y 10% de DMSO. La composición de las formulaciones y la preparación de la misma fueron como se describe en el Ejemplo 6 anterior.

Los resultados (Figura 15) indican que estos compuestos eran capaces de disminuir el tamaño (Figura 15A) y el peso (Figura 15B) de los tumores derivados de células HT-29.

EJEMPLO 8: EFICACIA *IN VIVO* DE LOS COMPUESTOS 3 5 Y 7 EN UN MODELO DE XENOINJERTO DE CARCINOMA DE PULMÓN MACROCÍTICO

La capacidad de los compuestos 3, 5, y 7 para inhibir el crecimiento de células de carcinoma de pulmón macrocítico *in vivo* se analizó en el modelo de xenoinjerto de ratón como se describe en el Ejemplo 6. Los compuestos se analizaron como formulaciones Lutrol (administradas por vía i.p.), formulaciones de micelas a base de lípidos (administradas por vía i.v.), formulaciones a base de agua (administradas por vía ip). Los controles del vehículo incluyen control de Lutrol (ip administrado ip), e control con micelas lipídicas (administradas i.v.), , el control con agua (administrada ip). Las formulaciones de Lutrol contenían 15% de Lutrol y 10% de DMSO. La composición de las formulaciones y la preparación de la misma fueron como se describe en el Ejemplo 6 anterior.

Los resultados (Figura 16) indican que los compuestos 3, 5, y 7 eran capaces de disminuir el tamaño (Figura 16A) y el peso (Figura 16B) de los tumores derivados de células NCI-H460.

EJEMPLO 9: CAPACIDAD DEL COMPUESTO 3 PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DE *KLF4* *IN VIVO*

La capacidad del compuesto 3 para modular la expresión de *KLF4* en xenoinjerto de tumor de colon HT-29 se determinó como sigue. En grupos de 10 ratones CD-1 hembra atímicas (6-7 semanas) se inyectó en la parte inferior dorsal células de adenocarcinoma de colon humano HT-29 (3 x 10⁶ células en 0,1 ml de PBS) por vía subcutánea. El tratamiento de los ratones con vehículo o 50 mg/kg/d del compuesto 3 se inició 5 días después de la inoculación (tamaño de los tumores = 20-40 mm³) para ciclos de cinco días y 2 durante toda la duración del experimento (35 días). Después del período de tratamiento, se sacrificó los animales, se extirparon los tumores, y el ARN total se extrajo a partir de 30 mg de tejido tumoral utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Valencia, CA). La expresión de ARNm de *KLF4* se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando el método comparativo de CT como se describe en el Ejemplo 19. El compuesto 3 indujo la expresión de *KLF4* en xenoinjertos de tumores de todos los ratones tratados con el compuesto 3 en aproximadamente 1,5 veces en comparación con xenoinjertos de tumores tratados con vehículo solo (Figura 17).

EJEMPLO 10: CAPACIDAD DEL COMPUESTO 3 PARA MODULAR LA EXPRESIÓN D EP21 *IN VIVO*

La capacidad del compuesto 3 para modular la expresión de p21 *in vivo* se determinó utilizando el modelo de xenoinjerto HT-29 de tumor de colon como se describe en el Ejemplo 5. La expresión de ARNm de p21 se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando el método comparativo de CT como se describe en el Ejemplo 9. El compuesto 3 indujo la expresión dep21 en xenoinjertos de tumores de todos los ratones tratados con el compuesto 3 en comparación con xenoinjertos de tumores tratados con vehículo solo (Figura 18).

EJEMPLO 11: CAPACIDAD DEL COMPUESTO 3 PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DE CICLONA D1 *IN VIVO*

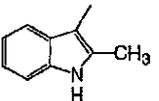
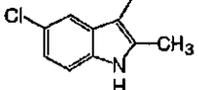
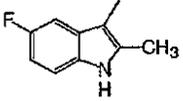
La capacidad del compuesto 3 para modular la expresión de ciclina D1 *in vivo* se determinó utilizando el modelo de xenoinjerto HT-29 de tumor de colon como se describe en el Ejemplo 26. La expresión de ARNm de ciclina D1 se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real como se describe en el Ejemplo 30. El compuesto 3 redujo de forma consistente la expresión de ciclina D1 en xenoinjertos de tumores de todos los ratones tratados con el compuesto 3 en comparación con xenoinjertos de tumores tratados con vehículo solo (Figura 19). Los resultados de este experimento combinados con los resultados descritos para el efecto del compuesto 3 *in vivo* en la expresión de *KLF4* y p21 tal como se describe en los Ejemplos 30 y 31 se muestran en la Figura 20.

EJEMPLO 12: ENSAYOS DE TOXICIDAD SUBAGUDA DE LOS COMPUESTOS

Para analizar la toxicidad subaguda de los compuestos de Fórmula I, se inyectó en los ratones hembra los compuestos y se evaluó la toxicidad en base a la mortalidad, cambios en el comportamiento, aspecto y peso. Brevemente, ratones hembra ICR normales (5-6 semanas de edad; n=33) que pesan cerca de 0,020 kg en peso corporal. se inyectaron diversos compuestos en 100 mg/kg y 50 mg / kg o con el vehículo solo (Lutrol (M68, micronizado)). En grupos de 3 ratones hembra ICR 3 se inyectó una inyección intraperitoneal (IP) de 250µl o de cada compuesto a 4,0 mg / ml dos veces al día (100 mg / kg) durante 1 semana (Grupo I); o una inyección intraperitoneal (IP) de 250µl o de cada compuesto a 2,0 mg / ml dos veces al día (50 mg / kg) durante 1 semana (Grupo II); o una inyección intraperitoneal (IP) de 250 µl de vehículo control Lutrol dos veces al día durante 1 semana (Grupo control).

Los compuestos a analizarse prepararon para proporcionar suficiente durante una semana a concentraciones de 4,0 mg / ml y 2,0 mg / ml. Brevemente, 50 mg de cada compuesto se disolvió en 1,25 ml de DMSO al 100% y se diluyó con 6,25 ml de Lutrol (30% en agua) y 5 ml de agua, para preparar una solución de compuesto 4mg/ml en 15% Lutrol en agua. A continuación, 4 ml de cada solución preparada se diluyeron adicionalmente con 4 ml de 15% de Lutrol en agua para proporcionar la solución de 2,0 mg / ml de cada compuesto. Para la solución de control del vehículo, se preparó 8 ml de 15% de Lutrol en agua. Los compuestos en concentraciones de 4,0 mg / ml y 2,0 mg / ml y el control del vehículo se administraron como se ha descrito anteriormente. La toxicidad se evaluó en base a la mortalidad, cambios en el comportamiento, el aspecto y el peso y se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Ensayos de toxicidad subaguda

Compuesto	R	Toxicidad subaguda + Toxicidad - letalidad -No tóxico	
		100mg/Kg	50mg/Kg
	H		
3*		+	-
5		-	-
7		-	-

(*no forma parte de la invención)

EJEMPLO 13: LOCALIZACIÓN SUBCELULAR IN VITRO DEL COMPUESTO EN CÉLULAS HT-29

La localización subcelular de los compuestos de Fórmula I en las células cancerosas se determinó como sigue. Dado que el compuesto 3 es intrínsecamente fluorescente, fue posible examinar su localización subcelular en las células cancerosas por microscopia de fluorescencia en células HT-29 de carcinoma de colon. Las células se trataron con 10 o 25 µM del compuesto 3 durante 5 minutos (Figura 21A) o 4 horas (Figura 21B y 21C), se lavaron una vez en PBS, se fijaron en formaldehído al 3,7% / PBS durante 10 minutos, se lavaron de nuevo tres veces, y se montaron con Cytoseal. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia de barrido con láser Zeiss con un rango de filtro de excitación de 360-370 nm. Los resultados se muestran en las Figuras 21A-C. Para las figuras 21A y 21B, las imágenes de contraste de interferencia diferencial se superpusieron con imágenes fluorescentes. Las figuras 21B y 21C son las mismas imágenes. El compuesto 3 entró en la célula en los primeros 5 minutos de tratamiento. y se distribuyó uniformemente por todo el núcleo y el citoplasma, pero fue excluido de la membrana plasmática de las células HT-29 (Figura 21A). A las 4 horas de tratamiento, el compuesto 3 fue localizado predominantemente alrededor del exterior del núcleo (región perinuclear), pero una porción todavía se encuentra dentro del núcleo (Figura 21B y 21C).

EJEMPLO 14: CAPACIDAD DE LOS COMPUESTOS DE LA FÓRMULA I PARA ESCINDIR EL ADN *IN VITRO*

El compuesto 3 analizó para determinar su capacidad para escindir el ADN plasmídico *in vitro* en presencia de cobre y el agente reductor ácido ascórbico. Los experimentos se realizaron en un total de 20 µl, que contiene tampón NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 10 mM (pH 6,7), 1 µg de ADN plasmídico superenrollado, 100 µM de ácido ascórbico compuesto de fármaco 25 µM (o vehículo), y 10 µM de CuSO₄·5H₂O. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 30 minutos, y se añadió 1 µl de 0,1 M EDTA para terminar la reacción. Se añadió tampón de carga de ADN, y las reacciones se realizaron a 80 V durante 80 minutos en un gel de agarosa al 1% que contiene bromuro de etidio. Tanto compuesto 3y

el control positivo 1,10-fenantrolina (OP) fueron capaces de escindir ADN plasmídico, convirtiendo las formas circular superenrollado y abiertas en fragmentos de ADN de bajo peso molecular. El compuesto no quelante 13, y el vehículo control DMSO, no fueron capaces de escindir el ADN (Figura 22A). Ni el compuesto 3 ni OP fueron capaces de escindir ADN en ausencia de cobre o de agente reductor

5 Para determinar si los iones, excepto los de cobre, podrían ser suficientes, también se llevaron a cabo reacciones de escisión de ADN en presencia de cinc o hierro. Las reacciones se realizaron como anteriormente, en presencia de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 25 μM ZnCl_2 , o $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Ni el cinc ni el hierro fueron capaces de reemplazar al cobre en las reacciones de escisión con el compuesto 3 (Figura 22B). Obsérvese que el cobre solo en presencia de ácido ascórbico puede cambiar la relación de ADN superenrollado para abrir el ADN circular.

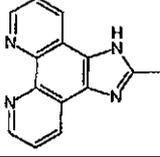
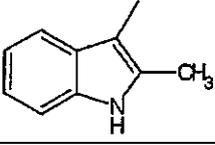
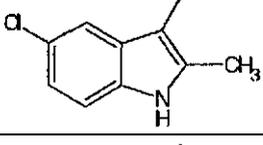
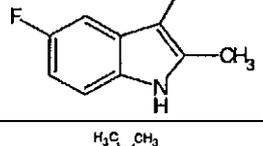
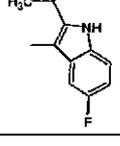
15 Para determinar las proporciones del compuesto de cobre en la que el compuesto 3 fue eficaz, las reacciones se realizaron como en la Figura 22A. Las proporciones de compuesto 3 y el cobre de 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,5:1, y 1:1, como se muestra en la Figura 23 se obtuvieron mediante el mantenimiento de la concentración de Cu constante a 10 μM , y la variación de la concentración de compuesto 3. Las proporciones de compuesto 3 y el cobre de 1:1,5, 1:2, 1:2,5, y 1:3, se obtuvieron mediante el mantenimiento de la concentración del compuesto 3 a 10 μM , y variando la concentración de cobre. El compuesto 3 escindió con eficiencia el ADN cuando estaba presente a una proporción superior a 1,5:1 con el cobre, y no fue capaz de escindir a proporciones de 1:1, 1:2, 1:2,5. Sin embargo, el compuesto 3 fue capaz de escindir en una proporción de 1:03 (Figura 22C). Estos resultados ayudan a proporcionar una indicación en cuanto a qué tipos de complejos de cobre - compuesto de 3 se están formando, y que son más citotóxicos.

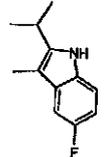
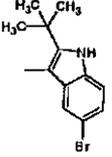
25 Otros compuestos de fórmula I, compuestos 5, 7, 9 y 13 también se analizaron para determinar su capacidad de escindir el ADN en una proporción de 2,5:1 con el cobre (Figura 23). Las proporciones de compuesto 3:cobre como se ha indicado además de las concentraciones de cobre en ausencia de compuesto 3 se utilizaron en el ensayo de escisión de ADN como se describe anteriormente. También se demostró que los compuestos 9 y 12 podían escindir el ADN.

EJEMPLO 15: ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE COLON HT-29

30 La capacidad de los compuestos de Fórmula I para inhibir la proliferación de células humanas de carcinoma de colon HT-29 se analizó como se describe en el ejemplo 3. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Actividad antiproliferativa de los compuestos de Fórmula I

R=Grupo sustituyente	Nombre	CI50	
		$\mu\text{g/ml}$	PM
3 	3*	0,6	349,4
5 	5	0,35	383,8
7 	7	0,7	367,4
65 	65	0,35	409,46

R=Grupo sustituyente	Nombre	CI50	
 82	82	0,61	395,43
 87	87	0,42	470,36
(*no forma parte de la invención)			

EJEMPLO 16: EFECTOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I

5 El factor-1 de transcripción de metales (MTF-1) es un factor de transcripción expresado constitutivamente que regula los genes diana mediante la unión a elementos de respuesta de metal, después de la activación por cinc. La activación de la MTF-1 en microambiente hipóxico de células tumorales de proliferación rápida, tras el estrés oxidativo inducido por hipoxia y la liberación de cinc a partir de los depósitos intracelulares, se asocia con el desarrollo y progresión del tumor. El factor 4 de tipo Kruppel (*KLF4*) es un miembro de la familia de factores de transcripción Sp/KLF, w, que regula los genes diana mediante la unión a las secuencias de ADN caja GC y la caja CACCC. *KLF4* es un regulador negativo del crecimiento celular por mecanismos tales como la activación de p21waf1/cip1y la supresión de la expresión de ciclina D1 contrarrestando una unión al promotor de ciclina D1 Sp1 del regulador positivo. El papel supresor tumoral de *KLF4* se ha reconocido en los cánceres de leucemia de células T, gastrointestinales, de vejiga y de próstata. MTF-1, Sp1 y autoregulación de *KLF4* son reguladores positivos cadena arriba de *KLF4*. Una serie de nuevas moléculas pequeñas que regulan por disminución la MTF-1 se han desarrollado y sus actividades antitumorales *in vitro* e *in vivo* se han sometido a detección. Los compuestos de Fórmula I se seleccionaron de más de 3.000 estructuras imidazol-fenantrolina por diseño estructural basado en ligando, como se muestra en la Figura 24.

20 Análisis de los efectos de los compuestos de Fórmula I en la inhibición *in vitro* e *in vivo* del crecimiento celular se realizó utilizando los métodos como se describe en los ejemplos precedentes. La inhibición del crecimiento celular por el compuesto parental 3 se sometió a detección selectiva mediante el ensayo de líneas celulares del o el Instituto Nacional del Cáncer y la leucemia, el cáncer de pulmón (macrofítico), cáncer de colon, el cáncer renal y de próstata fueron especialmente sensibles al compuesto 3 El GI₅₀ promedio de todas las líneas celulares analizadas fue de 0,62 M, como se muestra en la Figura 2.

25 La inhibición del crecimiento celular por el compuesto 3 se sometió a detección selectiva mediante el ensayo de fibras huecas del Instituto Nacional del Cáncer. Una puntuación total de 20 o más con una puntuación subcutánea de al menos 8 de células muertas de cualquier línea celular se considera como un compuesto anticanceroso significativamente activo. El compuesto 3 exhibió una puntuación total de 32, con la puntuación subcutánea de 10 y la muerte de células positivas, como se muestra en la Tabla 5 ant.

30 La inhibición del crecimiento de células tumorales se observa *in vitro* en ensayos de proliferación de células cancerosas y en ensayos de fibra hueca *in vivo* y en modelos de xenoinjerto de tumor en ratones, por los compuestos de Fórmula I en diferentes tipos de células de cáncer.

EJEMPLO 17: CAPACIDAD *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I PARA MODULAR LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *KLF4* EN LÍNEAS CELULARES CANCEROSAS HUMANAS

40 La inhibición del crecimiento celular CI₅₀ (µM) por los compuestos de Fórmula I se analizó en varios tipos de células cancerosas mediante el ensayo de proliferación celular XTT. Se observó una CI₅₀ baja o submicromolar en diferentes tipos de cáncer como se muestra en la Tabla 8. Los efectos inhibitorios del crecimiento de los compuestos de Fórmula I, como se muestra a continuación para la línea celular de melanoma SK-MEL-2 fueron reproducibles por Lorus Therapeutics Inc

45 Los valores de CI₅₀ para los compuestos de Fórmula I en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-435 fueron entre 0,2 µM y 0,6 µM como se muestra a continuación en la Tabla 8.

50 Los niveles de expresión génica de *KLF4*, inducida por los compuestos de Fórmula I, también se examinaron en varios tipos de células de cáncer por RT-PCR. Los cambios en *KLF4* en las células tratadas con el compuesto se expresaron en relación a la expresión *KLF4* en las células de control tratadas con vehículo de respectivo tipo de célula como "1". El aumento de expresión *KLF4* se observó en diferentes tipos de cáncer, también se muestran en la tabla 8. Estudios de expresión génica han revelado que el patrón de la expresión génica para la línea celular de cáncer de mama

- 5 MDA-MB-435 se asemeja más a la de las líneas celulares de melanoma que de otras líneas tumorales de mama (Ross et al. (2000) Nat Genet 24(3): 227-233). Además, los xenoinjertos de MDA-MB-435 implantados en almohadillas de grasa mamaria de ratones SCID hembra han demostrado tinción inmunohistoquímica consistente con origen melanocítico (Ellison G, Klinowska T, Westwood RF, Docter E, French T, Fox JC. (2002) Mol Pathol. 55(5): 294-299). Se puede esperar que la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-435 funcione de manera diferente que las otras líneas celulares de cáncer de mama.

Tabla 8: Inhibición del crecimiento celular Cl_{50} (μM) y Modulación de la Expresión Génica KLF4 por compuestos de fórmula I en diferentes tipos de células del cáncer

Línea celular	Cáncer	Cl_{50} (inhibición del crecimiento celular)						KLF4 (incremento génico)					
		CMP 3	CMP 7	CMP 63	CMP 64	CMP 69	CMP 3	CMP 7	CMP 63	CMP 64	CMP 69		
HT-29	colon	0,71	0,8	0,2	0,15	0,2	6,5	8,66	5,98	5,96	6,54		
HCT-116	colon	0,2	0,15	0,3	0,2	0,16	5,88	6,15	2,82	3,05	3,11		
H-460	Pulmón	2,9	2,6	0,4	0,3	0,4	3,4	2,1	1,55	1,64	1,95		
DU-145	Próstata	0,35	0,22	0,4	0,3	0,4	9,16	11,24	12,95	6,75	7,46		
PC-3	Próstata	0,3	0,21	0,32	0,46	0,34	16,28	12,17	1,34	1,36	0,95		
MDA-MB-231,	de mama	5	5	3,7	5	3,3	1,52	1,6	1,77	2,06	1,61		
MDA-MB-435	de mama	0,35	0,2	0,5	0,5	0,6	9,09	11,71	7,67	7,59	8,91		
CCRF-CEM	leucemia	0,42	0,4	0,3	0,25	0,2	28,05	48,5	76,37	73,77	74,29		
MOLT-4	leucemia	0,15	0,07	0,2	0,175	0,2	44,79	173,6	223,63	265,03	276,28		
SK-MEL-2	melanoma	0,25	0,2	0,17	0,2	0,18	2,38	3,32	5,46	5,35	4		

EJEMPLO 18: EFICACIA *IN VIVO* DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I EN MODELOS DE XENOINJERTO DE CARCINOMA DE PULMÓN MACROCÍTICO Y CARCINOMA DE COLON

5 La inhibición del crecimiento tumoral por los compuestos de Fórmula I en modelos de xenoinjertos de ratón se muestra en la Figura 25. Los estudios de la vía de administración y de programación para el carcinoma de células no pequeñas de pulmón (H460) (Figura 25A) y adenocarcinoma de colon (HT-29) (Figura 25B), la dosis mínima efectiva para carcinoma de pulmón macrocítico (H460) (Figura 25C) , y la eficacia de los compuestos optimizados de Fórmula I del carcinoma de pulmón macrocítico (H460) (Figura 25D).

10 EJEMPLO 19: EFECTO DE METALES EXÓGENOS SOBRE LA CAPACIDAD DEL COMPUESTO 3 PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON HT29 *IN VITRO*

15 La inhibición del crecimiento celular inducida por agotamiento de cinc se muestra en la Figura 26. Efecto de los suplementos de iones de metal en el compuesto 3 mediada por la inhibición del crecimiento celular de células HT-29 se examinó mediante ensayo de proliferación celular XTT. La inhibición del crecimiento celular se invirtió completamente por el cinc solo como se muestra en la Figura 26A y 26B.

20 EJEMPLO 20: CAPACIDAD *IN VITRO* DEL COMPUESTO 3 Y EL COMPUESTO 7 PARA BLOQUEAR LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS HT-29

El análisis del ciclo celular se evaluó mediante citometría de flujo en células HT-29 tratadas con el compuesto 3 como se muestra en la Figura 27A y el compuesto 7 como se muestra en la Figura 27B. La detención del ciclo celular en la fase G1 / S se observó después del tratamiento.

25 EJEMPLO 21: CAPACIDAD *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS DE LA FÓRMULA I PARA QUELAR METALES

30 La propiedad de metal-quelación del compuesto 3 y el compuesto 7 se muestra en la Figura 28. El ensayo de unión a metales *in vitro* de 4-(2-piridilazo) resorcinol (PAR) mostró que la unión de Zn y Cu⁺² a PAR fue atenuada por el compuesto 3, lo que indica la propiedad quelante *in vitro* de Zn y Cu⁺² del compuesto 3. Los resultados se muestran en las Figuras 28A (ZnCl₂), 28B (CuCl₂) y 28C (FeCl₂). El análisis *In vitro* de 4-(2-pyridilazo) resorcinol (PAR) unión a cinc se realizó del siguiente modo. Por triplicado en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Sarstedt, Newton, NC), 10 mL de volumen de las concentraciones finales indicadas de ZnCl₂ en Tris-HCl 0,2M, pH 7.5 se incubaron con 10 µl de 80% de acetonitrilo-20% de control de vehículo DMSO o las concentraciones finales indicadas de los compuestos de Fórmula I, disueltos en 80% de acetonitrilo-20% DMSO, durante 15 min a temperatura ambiente. Después, 80µL de volumen de PAR a la concentración final de 200 µM en Tris-HCl 0,2M, pH 7.5 se añadieron y se midió el desarrollo de color del complejo PAR-Zn²⁺ mediante un espectrofotómetro de varios pocillos (Bio-Tek Instruments Inc.) at 500 nm.

40 EJEMPLO 22: CAPACIDAD *IN VITRO* DEL COMPUESTO 3 PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DE LOS GENES SENSIBLES A METALES EN CÉLULAS HT-29

45 Cambios en la expresión de los genes sensibles a metales en células HT-29, en comparación con los quelantes de metal específica respectivos, se examinaron mediante RT-PCR como se muestra en las figuras 29A, 29B y 29C. El efecto del tratamiento con el compuesto 3 y el compuesto 7 sobre las expresiones de una metalotioneína 1A de proteína de almacenamiento de cinc (MT1A) (Figura 29A), un transportador de cobre, Ctrl también conocido como SLC31A1 (Figura 29B) y un transportador de hierro; receptor de transferrina 1 (TfR1) (Figura 29C) se mide y se compara con un quelante conocido de cinc TPEN, una tetramina quelante de cobre y un quelante del hierro DFO, respectivamente. A pesar de quelación *in vitro* de Cu⁺², el aumento del gen sensible al cobre después del tratamiento con el compuesto de tratamiento 3 fue transitorio Por el contrario, la disminución sostenida del gen sensible a cinc indicó depleción de cinc intracelular como una consecuencia significativa tras el tratamiento con el compuesto 3.

50 EJEMPLO 23: CAPACIDAD DE LOS COMPUESTOS DE LA FÓRMULA I PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DE MTF-1 Y CICLINA D1 *IN VIVO*

55 La correlación entre la expresión del factor de transcripción MTF-1 y un regulador del ciclo celular ciclina D1 en tejidos de xenoinjerto de cáncer de colon HT-29 se muestra en la Figura 30. Sobre la base de la presencia de secuencias de ADN de unión MTF-1-putativas en la región promotora del gen de la Ciclina D1 (que se muestra en la Figura 30A), los niveles de expresión de MTF-1 y Ciclina D1 en los tejidos de xenoinjertos se analizaron mediante RT-PCR, usando extracto de ARN tisular. La disminución de la expresión de MTF-1 se correlacionó con la disminución de la expresión de ciclina D1 con el compuesto 3 como se muestra en la Figura 30B y el compuesto 7 como se muestra en la Figura 27B.

60 EJEMPLO 24: CAPACIDAD DEL COMPUESTO 3 PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DE MTF-1 Y CICLINA D1 *IN VIVO*

65 La correlación entre MTF-1 y la expresión de genes de ciclina D1 en células HT-29 se muestra en la Figura 31. Disminuciones dependientes del tiempo de las expresiones de MTF-1 (Figura 31A) y ciclina D1 (Figura 31B) medidas

mediante RT-PCR se observaron después del tratamiento con el compuesto 3. Disminución de la expresión de ciclina D1 (Figura 31D) se observó después de la inactivación del gen de MTF-1 mediante siRNA. Los niveles de MTF-1 después de la inactivación del gen de MTF-1 mediante siRNA se muestran en la Figura 31C

- 5 La expresión y la actividad de la MTF-1 se reducen en los compuestos de Fórmula I. La regulación por disminución de la MTF-1 se correlaciona con una disminución de la expresión de ciclina D1n.

EJEMPLO 25: CAPACIDAD DEL COMPUESTO 3 PARA MODULAR LA ACTIVIDAD DE UNIÓN A *KLF4* *IN VITRO*

- 10 La disminución de la expresión de MTF-1 que conduce a la inducción del supresor tumoral *KLF4* se muestra en la Figura 32. Sobre la base de la superposición de los sitios de unión del factor de transcripción sobre la región promotora del gen *KLF4* (como se muestra en la Figura 32A), la unión de MTF-1 puede favorecer el incremento de la unión de otros inductores del *KLF4*; Sp1 y *KLF4*. El aumento de las actividades de unión del ADN del Sp1 (Figura 32B) y *KLF4* (Figura 32C), partir de los extractos nucleares de células HT-29, se mostraron mediante el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA).

- 15 El ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) se realizó como sigue. Los extractos nucleares de células HT-29 (10^7 células en placa de cultivo de 1000 mm en cada grupo experimental) se prepararon utilizando el kit de extracción nuclear (Panomics, Redwood City, CA). Los ensayos se realizaron con los kits EMSA *KLF4* y Sp1 EMSA "Gel-Shift" (Panomics), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se usaron 5 g de extracto nuclear para cada reacción de unión. Después de 30 min de reacción de unión, las muestras se separaron en gel de poliacrilamida 6% a 4 °C a 120 V, y se transfirieron a una membrana de nylon BrightStar™-Plus con carga positiva. Las sondas marcadas con biotina en la membrana se visualizaron utilizando el sistema de detección ECL (Panomics).

- 25 La disminución de la actividad de MTF-1 favorece la inducción de *KLF4* por los reguladores positivos; autoregulación de Sp1 y *KLF4*.

EJEMPLO 26: CAPACIDAD DEL COMPUESTO 3 PARA MODULAR LA UNIÓN DE *KLF4* AL PROMOTOR DE LA CICLINA D1 *IN VITRO*

- 30 El aumento de expresión de *KLF4*, que conduce a la represión de ciclina D1 en células HT-29 se muestra en la Figura 33. Sobre la base de la superposición de los sitios de unión del factor de transcripción sobre la región promotora del gen de la ciclina D1 (Figura 33A), el aumento de la unión de un regulador negativo de *KLF4* puede sustituir a la unión de Sp1 un regulador positivo. La unión *In vivo* de *KLF4* y Sp1 al promotor de la ciclina D1 se mostró mediante el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) (Figura 33B). Se observó un aumento de *KLF4* y disminución de la unión a Sp1 después del tratamiento con el compuesto 3.

- 35 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se realizó como sigue. Los lisados celulares de células HT-29 ($5,5 \times 10^5$ células en tres placas de 15 cm en el cultivo de cada grupo experimental) se prepararon en el final de los experimentos indicados, y los ensayos de chip se realizaron utilizando anticuerpos anti-*KLF4* y anti-Sp1 (Santa Cruz de Biotecnología Inc) y el kit de chip-ITTM (Activo Motif, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores que abarcan la región 231 a -92 del promotor de la ciclina D1; 5' cebador (5'-CGGACTACAGGGCAA-3') [SEC ID N°:1] y el cebador 3'(5'-GCTCCAGGACTTT- GCA-3') [SEQ ID NO:2] se sintetizaron *in vitro*.

- 45 El incremento de la unión de *KLF4* (un regulador negativo) al promotor de la ciclina D1 inhibe la unión de Sp1 (un regulador positivo) y reprime la expresión de ciclina D1n.

EJEMPLO 27: CAPACIDAD *IN VITRO* DEL COMPUESTO DE 3 PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO CELULAR Y MODULAR LA EXPRESIÓN DE *KLF4* EN CÉLULAS HT-29

- 50 La importancia de expresión *KLF4* en el crecimiento celular HT-29 se muestra en la Figura 34. La expresión de genes *KLF4* medida mediante RT-PCR mostró una inactivación eficaz del gen *KLF4* mediante siRNA (Figura 34A). La proliferación celular medida mediante el ensayo de XTT mostró la pérdida de inhibición del crecimiento celular mediada por el compuesto 3 tras la inactivación del gen *KLF4* mediante siRNA (Figura 34B).

- 55 La transfección del ARN pequeño de interferencia (ARNsi) se realizó del siguiente modo: ARNsi de MTF-1 prediseñado (ID #115734) (Ambion, Austin, TX) se utilizó para inactivar el ARNm endógeno de MTF-1. De un modo similar, el ARNsi de *KLF4* prediseñado (ID #115492) (Ambion, Austin, TX) se utilizó para inactivar el ARNm endógeno de *KLF4*. Un ARN inespecífico, de doble cadena

- 60 (5'r(CUAGGGUAGACGAUGAGAG)d(TT)3') [SEC ID N° 3] y

(3'd(TT)r(GAUCCCAUCUGCUACUCUC)5') [SEC ID N:4]

- 65 se sintetizó en Qiagen (Cambridge, MA) sobre la base de la secuencia de un gen no relacionado. las células HT-29 (3×10^5 células en placas de 35 mm de cultivo) se transfectaron con las concentraciones indicadas de ARNsi o control de

mezcla de ARN utilizando el reactivo de transfección Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, durante 6 horas. Al finalizar el periodo de incubación el medio de transfección se complementó con un medio de crecimiento completo y las células se incubaron a 37 °C durante 24 horas antes de los experimentos indicados.

5 EJEMPLO 28: EFECTO DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I EN EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS GRANDES HUMANO CARCINOMA PULMONAR (H460) EN CD-1 RATONES DESNUDOS

10 La inhibición del crecimiento tumoral por los compuestos de Fórmula I en modelos de xenoinjerto de ratón de carcinoma de pulmón de células grandes humano (H460) se llevó a cabo como se describe en los Ejemplos anteriores. Los resultados se muestran en la Figura 35.

EJEMPLO 29: QUELACIÓN *IN VITRO* DE LOS IONES DE CINC POR LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I

15 Para determinar la propiedad de quelación del compuesto 3 con iones de cinc *in vitro*, los iones de cinc disponibles libres se midieron mediante espectrofluorimetría usando colorante Zinquin fluorescente sensible a cinc, después de la pre-incubación de ZnCl₂ con diferentes concentraciones de compuesto 3 (Figura 36). El ZnCl₂ 2 μM se incubaron con concentraciones indicadas de compuesto 3, en solución salina tamponada con fosfato (PBS), seguido de la adición de Zinquin, a 10 mM de concentración final durante 30 min, la fluorescencia de Zinquin tras la unión de cinc se midió en un espectrofluorómetro Fluoroskan de luminiscencia, a una excitación de 364 nm y 485 nm de longitudes de onda de emisión.

20 Se observó disminución dependiente de la dosis en Zinquin de fluorescencia, lo que indica la unión de menos de iones de cinc a Zinquin como resultado de la quelación del compuesto 3 con iones de cinc. Un experimento similar con FeCl₂ and CuSO₄ no mostró fluorescencia de Zinquin, lo que indica la especificidad de la fluorescencia de Zinquin sólo por los iones de cinc.

EJEMPLO 30: QUELACIÓN DE IONES DE CINC INTRACELULAR EN LAS CÉLULAS HT-29 *IN VITRO* DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON COMPUESTOS DE FÓRMULA I

30 Para determinar la propiedad de quelación del compuesto 3 con iones de cinc las células HT-29 con o sin precargado con ZnCl₂ 35 μM se trataron con el compuesto 3, un conocido quelante de cinc o vehículo control (DMSO), y el cinc libre intracelular se determinó mediante la medición de la fluorescencia de Zinquin como se describe en el ejemplo anterior (Figura 37). Las células HT-29 cells (4x10⁵ células / grupo) fueron pretratadas con 35 mM de ZnCl₂ durante 20 minutos, seguido de la adición de las concentraciones indicadas del compuesto 3 o TPEN y Zinquin 10 mM durante 30 min a 37 °C, y se midió el recuento de fluorescencia (Figura 37A). Para la medición de la quelación de iones de cinc endógenos en células HT-29, (1,5x10⁶ células / grupo) se trataron con las concentraciones indicadas de compuesto 3 y Zinquin 10 mM durante 30 min a 37 °C, y se midió el recuento de fluorescencia (Figura 37B).

40 La disminución dependiente de la dosis de los niveles precargados y endógenos de cinc se observaron después del tratamiento con compuesto de 3 o con TPEN.

EJEMPLO 31: EFECTO DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I EN LA QUELACIÓN DE CINC Y LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA METALOTIONEÍNA 1A EN CÉLULAS HT-29 *IN VITRO*

45 Para confirmar la disminución en el nivel intracelular de cinc tras el tratamiento con el compuesto 3 se midió la alteración en la expresión génica de la metalotioneína de almacenamiento de cinc-proteína 1A (MT1A) como un marcador de estado de cinc intracelular.

50 Las células HT-29 se trataron con 1 mM del compuesto 3 durante el tiempo indicado y la expresión génica MT1A se midió como sigue. El ARN total se extrajo mediante el método de TRIZOL y nivel de expresión génica se determinó por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-PCR). La expresión génica de MT1A se normalizó con la expresión del gen de la β-actina en la misma muestra. El cambio en MT1A se expresó en relación con el nivel de control de MT1A DMSO en los respectivos puntos de tiempo. La disminución en la expresión génica de MT1A fue evidente después de 8 h de tratamiento como se muestra en la Figura 38A.

55 Para verificar que la expresión del gen MT1A refleja el nivel intracelular de cinc, las células HT-29 se trataron con 1 mM del compuesto 3, 35 μM ZnCl₂ o compuesto 3 y ZnCl₂ juntos durante 16 horas (Figura 38B). La expresión génica de MT1A se determinó mediante RT-PCR como se describe anteriormente. La expresión génica de MT1A se elevó en respuesta a un aumento de iones intracelulares de cinc en de ZnCl₂ Células tratadas. La disminución en la expresión de MT1A en respuesta al agotamiento intracelular de cinc, después del tratamiento con el compuesto 3 se invirtió mediante la adición de suplemento de cinc (Figura 38B).

60

EJEMPLO 32: EFECTO DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I EN LA QUELACIÓN DE CINCO Y LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TIPO KRUPPEL 4 (*KLF4*) EN CÉLULAS HT-29 *IN VITRO*

5 El cambio en la expresión génica de *KLF4* en el agotamiento de cinc tras el tratamiento con el compuesto 3 se determinó por RT-PCR de la siguiente manera. Las células HT-29 se trataron con 1 μM del compuesto 3 durante el tiempo indicado (Figura 39A) o las células HT-29 se trataron con 1 μM del compuesto 3, 35 μM ZnCl_2 o compuesto 3 y ZnCl_2 juntos durante 16 horas (Figura 39B). El ARN total se extrajo y el nivel de la expresión génica se determinó por RT-PCR.

10 Se observó un aumento dependiente del tiempo en *KLF4* después de 4 h de tratamiento de células HT-29 con 1 μM del compuesto M 3 y el máximo aumento tuvo lugar a las 16 h oras (Figura 39A). El aumento en la expresión génica de *KLF4* se invirtió mediante la adición de suplemento de cinc (Figura 39B), lo que indica la importancia del cambio en la expresión génica de *KLF4* en respuesta al estado de cinc intracelular.

15 EJEMPLO 33: EFECTO DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y LA ACTIVIDAD DE UNIÓN AL ADN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN 1 (MTF-1) QUE SE UNE AL ELEMENTO RESPONDEDOR A METALES SENSIBLE A CINCO (MRE) EN CÉLULAS HT-29 *IN VITRO*

20 La expresión del gen de la MTF-1 se examinó por RT-PCR tras el tratamiento de células HT-29 con 1 μM del compuesto 3 durante el tiempo indicado. La disminución en la expresión génica de MTF-1 fue evidente después de 8 h de tratamiento como se muestra en la Figura 40A.

25 Para verificar el cambio en la actividad de MTF-1 a un tiempo de incubación temprano, antes de la disminución significativa en la expresión génica de MTF-1, la translocación nuclear de MTF-1 y la actividad de unión a ADN se determinó en el extracto nuclear de células HT-29 tratadas con el compuesto 3 durante 4 horas, mediante el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) del siguiente modo. Las células HT-29 se trataron con DMSO, ZnCl_2 35 μM (control positivo) y 1 μM del compuesto 3 durante 4 horas. La proteína nuclear se extrajo y se incubó con MTF-1 sondas de oligonucleótidos de unión marcados con biotina. La movilidad retardada de la sonda marcada tras la unión a MTF-1 se observó como un cambio de banda (Figura 40B). Se observaron tres bandas de desplazamiento (flechas de bloque) en el carril 1 (DMSO), que muestra el patrón de unión al ADN constitutivo de la MTF-1. En los grupos tratados con zinc, se observaron 2 bandas de desplazamiento adicionales (flechas abiertas) (Carril 3), que indica el aumento de la actividad de MTF-1 dependiente de cinc. Las bandas de desplazamiento activadas por cinc no se observaron en el grupo tratado con el compuesto 3 (carril 5), lo que indica que la actividad de MTF-1 dependiente de cinc no se incrementó por el compuesto 3. Se añadió un exceso de sondas no marcadas en el carril de 2, 4 y 6 para competir con las sondas marcadas de unión con MTF-1 en el extracto nuclear, que muestra la especificidad de las bandas de desplazamiento de MTF-1 en los carriles 1, 3 y 5, respectivamente.

35 En comparación con las bandas de cambio de movilidad observadas en el grupo tratado con ZnCl_2 - control positivo no se observaron cambios significativos en el desplazamiento de la movilidad en las células tratadas con el compuesto 3, lo que confirma que la actividad de MTF-1 dependiente de cinc no se incrementó por el compuesto 3.

EJEMPLO 34: CAPACIDAD *IN VITRO* DEL COMPUESTO 3 PARA MODULAR LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL Oponente de *KLF4*- FACTOR DE TIPO KRUPPEL 5 (*KLF5*) EN CÉLULAS HT-29

45 *KLF 4* y *5* son dos miembros estrechamente relacionados de la familia de los factores de transcripción pero *KLF5* estimula la proliferación celular mientras *KLF4* inhibe el crecimiento celular (Ghaleb et al., (2005) Cell Res. 15(2): 92-96). *KLF 4* y *5* se unen a la secuencia consenso de ADN rico en GC similar pero exhiben actividades transcripcionales contrarias. *KLF4* puede auto-activar su propio gen mediante la unión a la región rica en GC en promotor de *KLF4* mientras que *KLF5* inhibe la transcripción de *KLF4* mediante la unión al mismo elemento de ADN (Dang et al., (2002) Nucleic Acids Res. 30(13):2736-2741).

50 Para identificar la consecuencia de la disminución de la expresión / actividad de MTF-1 en relación a la inducción de *KLF4*, el ARNm de MTF-1 se inactivó usando el ARNsi dirigido a MTF-1 y las expresiones génicas de *KLF4* y *KLF5* se midieron por RT-PCR de la siguiente manera. Las células HT-29 se transfectaron con 100 nM de ARNsi de MTF-1 durante 6 horas, usando el reactivo Lipofectamina 2000. Después de la sustitución del medio de transfección con medio de crecimiento normal y la incubación durante 18 horas, el ARN total se extrajo y el nivel de la expresión génica se determinó por RT-PCR. Después de la inhibición de la traducción de MTF-1 mediante el uso de ARNsi específico del gen de MTF-1, se observó disminución de la expresión del gen *KLF5* mientras que la expresión *KLF4* se incrementó (Figura 41A).

60 La disminución de la expresión de genes de *KLF5* después del tratamiento durante el tiempo con el compuesto 3 también se determinó como sigue. Las células HT-29 se trataron con 1 μM del compuesto 3 durante el tiempo indicado (Figura 41B). El ARN total se extrajo y el nivel de la expresión génica se determinó por RT-PCR. De acuerdo con el resultado anterior, también se detectó la disminución en la expresión de genes *KLF5* en células HT-29 después del tratamiento de 4 horas con 1 μM del compuesto 3 (Figura 41B).

65

EJEMPLO 35: CAPACIDAD *IN VITRO* DEL COMPUESTO 3 PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DEL GEB DE LA PROTEÍNA P21 REGULADORA DEL CICLO CELULAR Y DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS HT-29

Se examinaron las expresiones de gen p21 y las proteínas después del tratamiento con el compuesto 3. La expresión génica de p21 en células HT-29 tratadas con 1 μ M del compuesto 3 se determinó en los tiempos indicados de la siguiente manera. El ARN total se extrajo y el nivel de la expresión génica se determinó por RT-PCR (Figura 42A). El nivel de proteína p21 en el lisado total de células se midió por ELISA (Figura 42B) de la siguiente manera. Las células HT-29 se trataron con 1 μ M del compuesto 3 con y sin 20 mM MG-132 (inhibidor de proteasoma) durante el tiempo indicado.

Se observó aumento de la expresión del gen de p21 después de 4 h de tratamiento con el compuesto 3 mediante RT-PCR (Figura 42A) pero un aumento comparable en la expresión de la proteína p21 no se detectó mediante cualquiera de los análisis de transferencia Western (datos no presentados) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Figura 42B). Sin embargo, se detectó un incremento del nivel de la proteína p21 cuando las células HT-29 se incubaron con el compuesto 3 en presencia de un inhibidor del proteasoma, MG-132, lo que indica que la proteína p21 se degrada rápidamente a pesar de un aumento significativo en la expresión del gen p21.

EJEMPLO 36: CAPACIDAD *IN VITRO* DEL COMPUESTO 3 PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CICLINA D1 REGULADORA DEL CICLO CELULAR

La expresión génica y proteica de la ciclina D1 después del tratamiento con el compuesto 3 se determinó por RT-PCR y Western Blot como se muestra en las Figuras 43A y 43B, respectivamente, del siguiente modo. Las células HT-29 se trataron con 1 mM del compuesto 3 durante el tiempo indicado. El ARN total se extrajo y el nivel de la expresión génica se determinó por RT-PCR. La expresión de la proteína ciclina D1 en el lisado de células HT-29 se determinó por SDS-PAGE seguido por transferencia Western.

La disminución tanto de genes (Figura 43A) como de la proteína (Figura 43B) los niveles de ciclina D1 se observaron después de 8 h de tratamiento con el compuesto 3.

EJEMPLO 37: CAPACIDAD *IN VITRO* DEL COMPUESTO 3 PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DEL GEN SUPRESOR TUMORAL RESPUESTA DE CRECIMIENTO TEMPRANO DE LA PROTEÍNA-1 (EGR-1)

Como Sp1, Egr-1 también es un factor de transcripción con dominios de unión al ADN de dedos de zinc, que reconoce las secuencias ricas en GC en la región promotora de regulación del gen diana (Al-Sarraj et al., (2005) J. Cell Biochem. 94 (1): 153-167). Se han detectado cambios en el Egr-1 la expresión génica en las células HT-29 tratadas con el compuesto 3 por RT-PCR (Figura 44A) como sigue. Las células HT-29 se trataron con 1 mM del compuesto 3 durante el tiempo indicado. El ARN total se extrajo y el nivel de la expresión génica se determinó por RT-PCR. Para determinar los efectos de suplemento de zinc, las células HT-29 se trataron con 1 μ M del compuesto 3, 35 μ M ZnCl₂ o compuesto 3 y ZnCl₂ juntos durante 8 horas. La expresión del gen de Egr-1 se determinó por RT-PCR (Figura 44B).

Se observó un aumento significativo en la expresión del gen Egr-1 tan temprano como 2 horas después del tratamiento con el compuesto 3 como se muestra en la Figura 44A y que fue reversible después de la adición de suplemento de cinc tal como se muestra en la Figura 44B.

EJEMPLO 38: CAPACIDAD *IN VITRO* DEL COMPUESTO 3 Y EL COMPUESTO 7 PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DEL GEN EN CÉLULAS HT-29

Los patrones de expresión génica en respuesta al compuesto 3 y al compuesto 7 se verificaron por RT-PCR (Figura 45) de la siguiente manera. Las células HT-29 se trataron con 1 μ M del compuesto 3 o el compuesto 7 durante 8 horas. El ARN total se extrajo y el nivel de la expresión génica se determinó por RT-PCR. Se observó un patrón de expresión similar de los genes de interés.

EJEMPLO 39: CAPACIDAD DEL COMPUESTO 3 PARA MODULAR LA EXPRESIÓN GÉNICA DE KLF4 Y CICLINA D1 EN EL MODELO DE XENOINJERTO DE CÁNCER DE COLON HT29

Para examinar el efecto de los cambios mediados por el compuesto 3 en las expresiones de KLF4 y ciclina D1 *in vivo*, las expresiones de los genes respectivos en los tejidos de xenoinjerto del vehículo control (Lutrol) y los ratones transplantados con células de cáncer de colon HT-29 tratados con el compuesto 3- se analizaron mediante RT-PCR (Figura 46). Brevemente, la expresión génica de KLF4 y ciclina D1 en los tejidos de xenoinjerto HT-29 después de 14 días de tratamiento con el compuesto 3 se midió como sigue. Los ratones trasplantados por vía subcutánea con células HT-29 se trataron con vehículo control (administrados *i.p.*) o 100 mg / kg de compuesto 3 (administrado por vía *ip*) durante 14 días (n = 6 en cada grupo). El ARN total se extrajo y el nivel de la expresión génica se determinó por RT-PCR. La expresión génica de KLF4 y Ciclina D1 se normalizó con la expresión del gen de la β -actina en la misma muestra. Los cambios en KLF4 y ciclina D1 se expresaron respectoto al promedio de la expresión génica respectiva de 6 ratones control tratados con Lutrol.

De acuerdo con el patrón de expresión en líneas celulares HT-29 *in vitro*, se observaron el aumento de gen KLF4 y la disminución de la expresión de los genes de ciclina D1 *in vivo*.

5 EJEMPLO 40: CAPACIDAD *IN VITRO* DEL COMPUESTO DE 3 PARA QUELAR CINCO A PARTIR DE LA PROTEÍNA DE ALMACENAMIENTO DE METALOTIONEÍNA CONC.

10 El cinc intracelular existe como un conjunto lábil unido de forma laxa de metalotioneínas proteínas de almacenamiento (MT), que almacenan hasta 7 u 8 de cinc por molécula. El conjunto de cinc lábil dona cinc a las enzimas o factores de transcripción, que requieren unión reversible con cinc para su actividad completa (Tapiero y Tew (2003) Biomed Pharmacother 57 (9): 399-411). La eficacia del compuesto 3 para eliminar el cinc de MT se investigó MT-1 asiladas de hígado de conejo, que contiene principalmente MT-1a y MT-2e con ~ 7 de cinc por molécula en $\geq 95\%$ de MT se adquirió en Alexis bioquímicos (Lausen, Suiza). Se midió el contenido de cinc en MT *in vitro* utilizando 4 - (2-piridilazo) resorcinol (PAR) ensayo colorimétrico de cinc como se describe en los Ejemplos precedentes. El cambio en la absorbancia de PAR después de la formación de complejos de iones de zinc-PAR se midió a 500 nm (Dinkova-Kostova et al., (2005) Biochemistry 44(18): 6889-6899). Para determinar la quelación de cinc a partir de MT-1 por el compuesto 3 *in vitro*, se añadió MT-1 25 μM en 100 ml de volumen de 0,2 M Tris-HCl, a pH 7,5 a la placa de 96 pocillos El compuesto 3 (0,15 a 60 mM) en 80% acetonitrilo/20% de DMSO se añadió a MT-1 durante 15 min a temperatura ambiente. PAR (200 μM en 0,2M Tris-HCl, pH 7.5 se añadieron y se midió el desarrollo de color del complejo PAR-cinc mediante un espectrofotómetro de varios pocillos a 500 nm en la Figura 47,

20 Reducciones dependientes de la dosis en la absorbancia de PAR de 25 M MT se observó después del tratamiento *in vitro* con dosis crecientes del compuesto 3 (figura 47), lo que demuestra la eliminación del cinc por el compuesto 3 de los conjuntos de cinc intracelular lábiles.

25 EJEMPLO 41: CAPACIDAD *IN VITRO* DEL COMPUESTO 3 PARA EFECTUAR LA ACTIVIDAD DE UNIÓN AL ADN DE MTF-1

30 Se investigó la eficacia del compuesto 3 para inactivar la actividad de unión al ADN del factor de transcripción de unión al elemento respondedor a etales del factor de transcripción que contiene dedos de cinc. La unión reversible del cinc a los dedos de cinc del MTF-1 se requiere para la transposición nuclear de la MTF-1 y la unión máxima de la MTF-1 al ERM (Lichtlen and Schaffner (2001) Bioessays 23(11): 1010-1017).

35 Las células HT-29 se trataron con 35 mM de ZnCl_2 durante 4 horas y el extracto nuclear a partir de células tratadas con cinc (MTF-1 activada con cinc) se trató con el compuesto 3 *in vitro* y la actividad de unión al ADN de MTF-1 a la secuencia del ERM se evaluó mediante el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) (Panomics, Redwood City, CA), La inactivación de la unión del ADN a MTF-1 por el compuesto 3 *in vitro* se muestra en la Figura 48A.

40 Para examinar la inactivación de MTF-1 por el compuesto 3 en las células HT.29, se trataron con el compuesto 3 durante de 1 a 4 horas y la actividad de unión al ADN de MTF-1 en el extracto nuclear se evaluó mediante EMSA. La disminución de la actividad de MTF-1 fue evidente después de 4 h de tratamiento de las células HT-29 con el compuesto 3 (Figura 48B).

45 EJEMPLO 42: CAPACIDAD DEL COMPUESTO 3 PARA MODULAR LA ACTIVIDAD DE UNIÓN AL ADN DE MTF-1 EN CÉLULAS HT-29

50 Para examinar la disminución de la unión de MTF-1 a la región promotora del gen diana de MTF-1, el gen regulador del ciclo celular de ciclina D1, Las células HT-29 se trataron con el compuesto 3 durante 16 horas y la unión de MTF-1 al promotor de la ciclina D1 se evaluó mediante ensayo de inmunoprecipitación de la cromatinaChIP (Active Motif, Carlsbad, CA), Al final de 16 h de tratamiento con el compuesto 3, las células se fijaron con formaldehído al 1% para reticular factores de transcripción y su cromatina objetivo. Los complejos de cromatina se cortaron y la cromatina unida a MTF-1 se bloqueó usando anticuerpos frente a MTF-1 (Santacruz Biotechnology Inc.). La reticulación se invirtió y el ADN MTF-1-asociado se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa usando los cebadores que abarcan desde la región de -231 hasta -92 del promotor de la ciclina D1. El 5' cebador (5'-CGGACTA-CAGGGCAA-3') [SEQ ID N°:1] y el cebador en 3' (5'-GCTCCAGGACTTTGCA-3') [SEC ID N°2] se sintetizaron *in vitro*. El incremento de la unión de MTF-1 al promotor de ciclina D1 se observó después del tratamiento con 35 μM de ZnCl_2 como se muestra en la Figura 49, lo que indica que la ciclina D1 está dirigida al gen MTF-1. La disminución de la unión de MTF-1 al promotor de ciclina D1 después del compuesto de 3 en comparación con los niveles basales de la unión a MTF-1, se observó, lo que indicó que el compuesto 3 inhibía la activación transcripcional constitutiva del gen de la ciclina D1 por MTF-1 (Figura 49).

65 EJEMPLO 43: EFECTO DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I EN LA QUELACIÓN DE CINCO Y LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA CICLINA D1 EN CÉLULAS HT-29 *IN VITRO*

Para identificar la vía de la regulación del ciclo celular que participa en el compuesto 3-mediada por la detención del ciclo celular como se muestra en el Ejemplo 20, en particular asociado con la fase G1 / S, la expresión del regulador

clave del ciclo celular clave de la progresión de la fase G1 / S, C, ciclina D1 se analizó. La expresión del gen de ciclina D1 como se mide por RT-PCR disminuyó significativamente después del tratamiento de células HT-29 con 1 µM del compuesto 3 durante 16 horas y que se invirtió en presencia de 25 mM de ZnCl₂, Lo que confirma que la disminución de la expresión de ciclina D1 fue consecuencia del agotamiento del cinc (Figura 50A). La disminución de la expresión de la proteína ciclina D1 también se confirmó por SDS-PAGE seguido por transferencia Western (Figura 50B). Además, la medición de la expresión de otros tipos de ciclina identificados disminuyó la expresión de ciclina E (Figura 50B).

EJEMPLO 44: EFECTO DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I SOBRE LA EXPRESIÓN DE MTF-1 EN CÉLULAS LHT-29 *IN VITRO*

Para evaluar la respuesta celular a la depleción de zinc, se examinó la expresión del factor de transcripción MTF-1 sensible a cinc. Se observó una disminución significativa en la expresión génica de la MTF-1 (Figura 51) tal como se mide por RT-PCR después de 8 h de tratamiento de las células HT-29 con 1 µM del compuesto 3 y que se recuperó por adición de suplemento de zinc, confirmando que la disminución de la expresión de MTF-1 por el compuesto 3 tratamiento fue consecuencia del agotamiento de zinc.

Las células HT-29 se trataron con ZnCl₂ y la expresión de gen de Ciclina D1 se midió por RT-PCR. Los cambios en la expresión génica se presentaron en relación con la expresión del gen de la ciclina D1 en las células de control. Se observó aumento de la expresión de gen Ciclina D1 después del tratamiento de las células con el zinc, como un activador de la MTF-1 (Figura 51B).

Las células HT-29 control o tratadas con ARsi de MTF-1 se trataron con o sin ZnCl₂ y la expresión de gen de Ciclina D1 se midió por RT-PCR. Los cambios en la expresión génica se presentaron en relación con la expresión del gen de la ciclina D1 en las células de control sin la transfección en el grupo de control y con respecto a la expresión del gen de la ciclina D1 en las células no específicas transfectadas con ARnsi para el grupo de la transfección. El aumento dependiente de cinc en la expresión de ciclina D1 se eliminó cuando el gen de MTF-1 se inactivó con ARnsi antes de la adición del compuesto 3 (Figura 51C).

EJEMPLO 45: CAPACIDAD *IN VITRO* DEL COMPUESTO 3 PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DE KLF4 EN CÉLULAS HT-29 CON INACTIVACIÓN DE MTF-1 MEDIADA POR ARNSI

Para evaluar la importancia de la disminución de la expresión de MTF-1 en la inducción de KLF4 la expresión de del gen KLF4 en respuesta al tratamiento con el compuesto 3 se midió mediante RT-PCR en células HT-29 transfectadas con ARnsi de MTF-1 A. Los cambios en la expresión génica de *KLF4* se presentaron en relación con la expresión de KLF4 en las células transfectadas con siRNA no específicos tratados con el vehículo control. La expresión basal del gen *KLF4* se redujo significativamente después de la inactivación del gen de MTF-1, indicando una transcripción del gen *KLF4* constitutiva dependiente de MTF-1 (Figura 52). Sin embargo, a expresión del gene KLF4 seguía aumentada tras el tratamiento con el compuesto 3 , a pesar de la inactivación del gen *KLF4* mediante siRNA (Figura 52). lo que sugiere activación del gel de *KLF4* independiente de MTF-1 tras el tratamiento con el compuesto 3.

EJEMPLO 46: EFECTO *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *KLF4*, *KLF2* Y *KLF6* EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PULMÓN MACROCÍTICO H-460

Los niveles de expresión de otros supresores tumorales potenciales;; *KLF2* (pulmón-KLF) (Wang et al., (2005) Oncogene 22(24): 3878-3885) y *KLF6* (Ito et al., (2004) Cancer Res 64(11): 3838-3843), evaluaron en la línea celular de carcinoma macrocítico H-460 Las expresiones de *KLF2*, 4 y 6 en las células H-460 control, se midieron por RT-PCR. La expresión génica se presentó en relación con la expresión de *KLF4* como "1" (Figura 53A). La expresión de *KLF4* era la más alta y sólo 0,05 y 0,3 de expresión de *KLF2* y 6 se han detectado en relación a la expresión *KLF4* como "1" (Figura 53A)

Las expresiones de *KLF2*, 4 y 6 en las células H-460 tratadas con vehículo control o con 2,5 µM del compuesto 3 o el compuesto 7, se midieron por RT-PCR. La expresión génica se presentó con respecto a la expresión génica respectiva en el grupo control tratado con vehículo como "1". El tratamiento con el compuesto 3 o el compuesto 7 también mostró un incremento de *KLF4* como gen cambiado más significativamente (Figura 53B)

EJEMPLO 47: EFICACIA *IN VIVO* DEL COMPUESTO 3 Y LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN SOBRE MTF-1, CICLINA D1 Y *KLF4* EN UN MODELO DE XENOINJERTO DE CÁNCER DE COLON

La eficacia de regresión del tumor del compuesto 3 se evaluó en ratones atímicos transplantados con células HT-29 tratadas con el compuesto 3 (Figura 54A), y se correlacionaron con las expresiones génicas de MTF-1, *KLF4* y ciclina D1 en tejidos de xenoinjerto HT-29 (Figura 54B). En ratones CD-1 desnudos atímicos (4 por grupo) se inyectó por vía subcutánea células HT-29 (3x10⁶ células en 0,1 ml de PBS). los 5 días después de la inoculación de células tumorales, se inyectó en los ratones por vía intraperitoneal 200 µl del vehículo control o 100 mg/kg del compuesto 3 durante 5 días, seguido de 10 días de intervalo, para 2 ciclos (días 5 a 9 como una primera inyección de ciclo y días 20 a 24 como un segundo ciclo de inyección) El tamaño del tumor se midió durante el curso del tratamiento usando compás (Figura

54A). Los ratones fueron sacrificados a los 34 días después de la inoculación de células tumorales. Los tejidos tumorales se extirparon, se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción de ARN y la expresión génica se analizó por RT-PCR (Figura 54B). Los cambios en la expresión génica se presentaron en relación con el promedio de 4 ratones de control inyectados con vehículo de control Lutrol

Se observó una reducción significativa en el tamaño del tumor en los ratones tratados con el compuesto 3, en comparación con los ratones de control inyectados con vehículo (Figura 54A). Análisis de la expresión génica en el tejido de xenoinjerto también mostró un aumento significativo en KLF4 y una disminución de las expresiones de MTF-1 y Ciclina D1 en ratones tratados con el compuesto 3 -en comparación con el grupo de control inyectado con vehículo (Figura 54B).

EJEMPLO 48: CAPACIDAD *IN VITRO* DEL COMPUESTO 3 Y EL COMPUESTO 7 PARA MODULAR LA EXPRESIÓN INDE MT1A, MTF-1, CICLINA Y *KLF4* EN CÉLULAS HT-29

La capacidad de los compuestos de Fórmula I para modular la expresión de genes de MT1A (Figura 55A) MTF-1 (Figura 55B), ciclina D1 (Figura 55C) y KLF4 (Figura 55D) se determinó por RT-PCR. Las células HT-29 se trataron con 1 µM del compuesto 3 o el compuesto 7, 35 µM de ZnCl₂, el compuesto 3 y ZnCl₂ juntos o compuesto 7 y ZnCl₂ juntos durante de 8 a 16 horas. La expresión génica respectiva se normalizó con la expresión del gen de la β-actina en la misma muestra. Los cambios en la expresión de genes se expresaron en relación con el respectivo nivel de genes de control de DMSO. Según se observó con 1 µM del compuesto 3 también se detectaron expresión disminuida de MT1A, MTF-1 y ciclina D1, y aumento de la expresión de *KLF4* con el compuesto 7. Para enfatizar que los cambios de expresión génica fueron la consecuencia del agotamiento de cinc intracelular la disminución de MT1A (8 horas) (Figura 55A), MTF-1 (8 h) (Figura 55B) y ciclina D1 (8 h) (Figura 55C) y el incremento de *KLF4* (16 h) (Figura 55D) tras el tratamiento con el compuesto 3 o el compuesto 7 se invirtió mediante la adición de suplemento con cinc.

Listado de secuencias

<110> Lorus Therapeutics Inc. et al.

<120> Derivados de 2-indolil imidazo[4,5-d]fenantrolina y usos de los mismos en el tratamiento del cáncer

<130> 335-173PCT

<140> N/A

<141> 2006-05-25

<150> 60/787.526

<151> 31/03/2006

<150> 60/710.551

<151> 22/08/2005

<150> 60/787.526

<151> 31/03/2006

<160> 4

<170> FastSEQ para la versión 4.0 de Windows

<210> 1

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 1

cggactacag gggcaa 16

<210> 2

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 473 597 T3

<220>
<223> Cebador

5 <400> 2
gctccaggac ttgca 16

<210> 3
<211> 21
<212> ARN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Hebra sentido no específica del oligonucleótido de ARNsi

15 <221> misc_feature
<222> (20).(21)

<223>n en las posiciones 20 y 21 son ADN (timidina)

20 <400> 3
cuagguaga cgaugagagn n 21

<210> 4
<211> 21
25 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

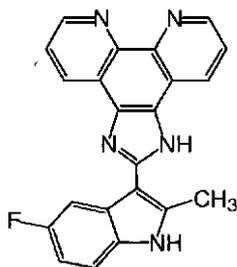
<220>
<223> Hebra antisentido no específica del oligonucleótido de ARNsi

30 <221> misc_feature
<222> (20).(21)

<223>n en las posiciones 20 y 21 son ADN (timidina)

35 <400> 4
cucucaucgu cuaccuagn n 21

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho compuesto es:



7

- 5 4. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha sal es una sal de HCl.
- 5 5. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicha composición es una formulación liposomal o de micelas de lípidos.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en la que dicha composición se formula para la administración intravenosa.
- 15 8. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto que lo necesite.
9. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en la inhibición de la proliferación de células de cáncer en un sujeto que lo necesite.
- 20 10. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en la inducción de la apoptosis en una célula de cáncer.
- 25 11. El compuesto para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho cáncer es un tumor sólido.,
12. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho tumor sólido se selecciona del grupo de: tumor de pulmón macrocítico, tumor de colon tumor de próstata, tumor de mama, y melanoma.
- 30 13. El compuesto para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho cáncer es la leucemia.
14. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el aumento de expresión del factor de tipo Krüppel 4 (KLF4) en una célula de cáncer.
- 35 15. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho cáncer es la leucemia. cáncer de vejiga o cáncer del tracto gastrointestinal.
- 40 16. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho cáncer del tracto gastrointestinal es cáncer de colon o cáncer colorrectal.
17. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en quelantes de iones de metales de transición en una aplicación no terapéutica.
- 45 18. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dichos iones de metales de transición son: iones de cinc, iones de hierro o iones de cobre.
19. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16, en el que dicho compuesto se formula como una formulación liposomal o de micelas de lípidos.
- 50 20. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16 y 19, en el que dicho compuesto se formula para administración intravenosa.

FIGURA 1

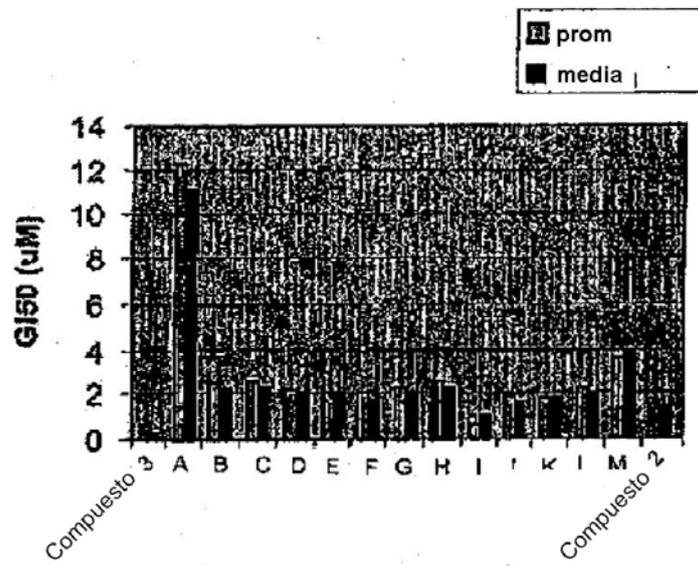


FIGURA 2

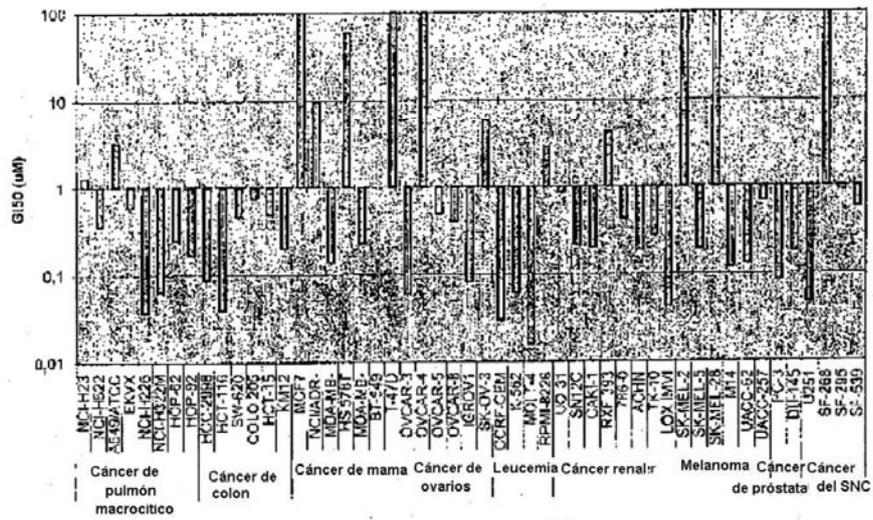


FIGURA 3

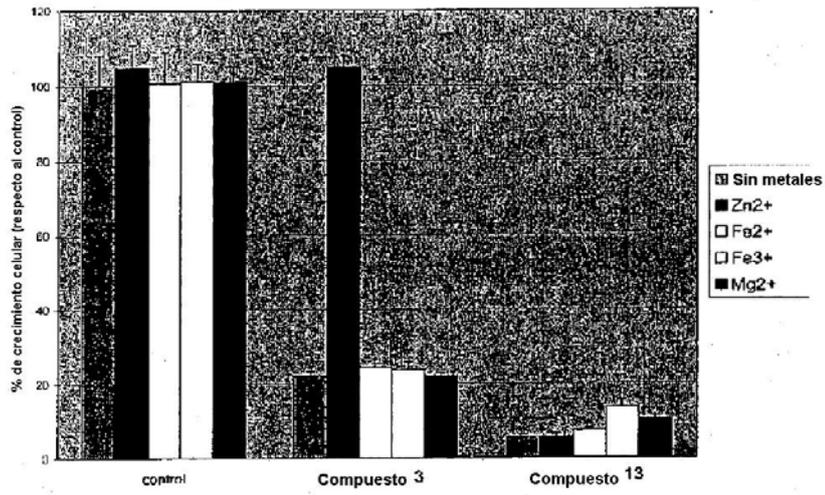


FIGURA 4

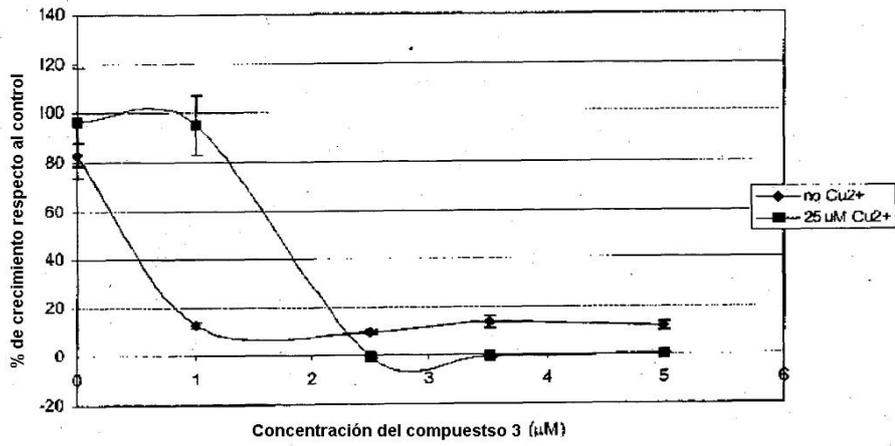


FIGURA 5

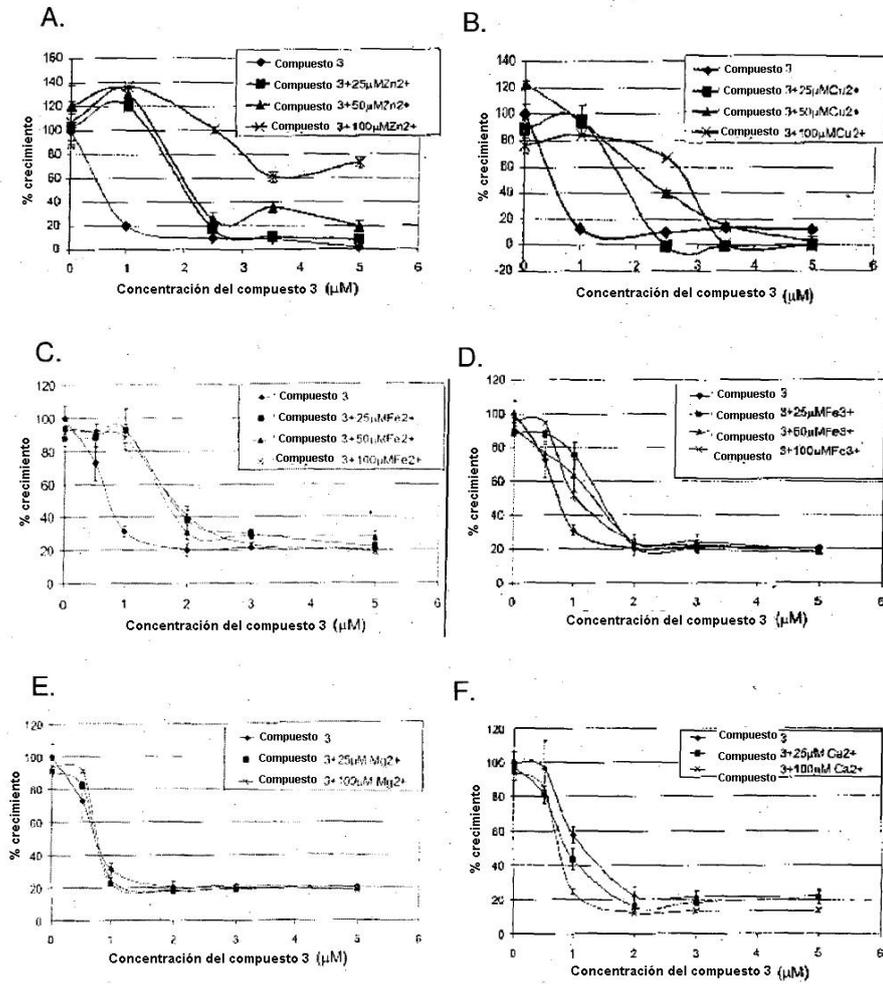
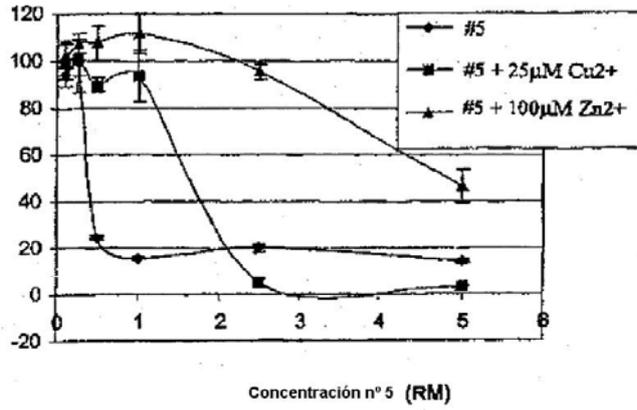


FIGURA 6

A.



B.

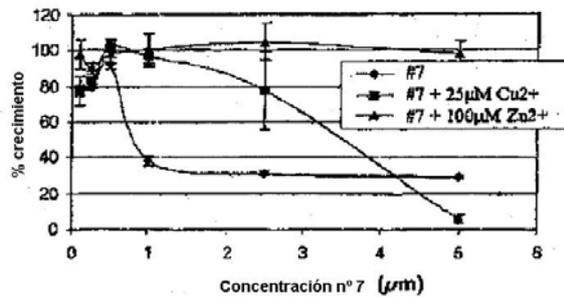


FIGURA 7

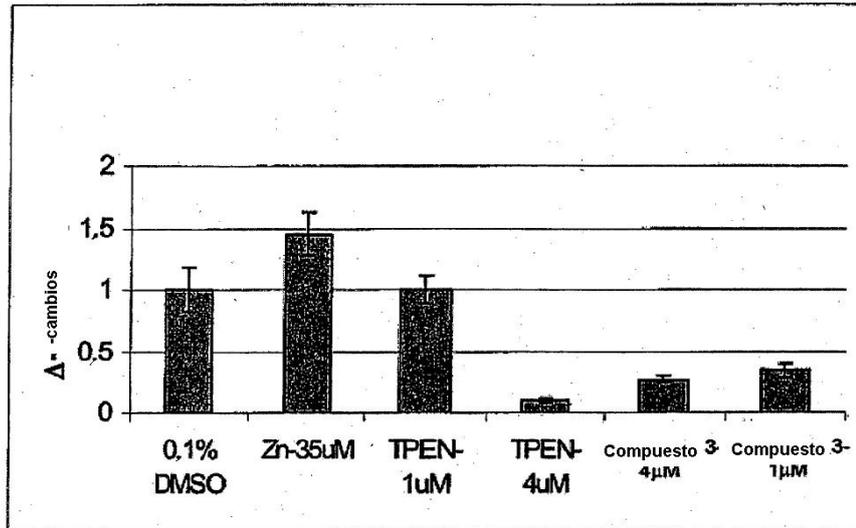


FIGURA 8

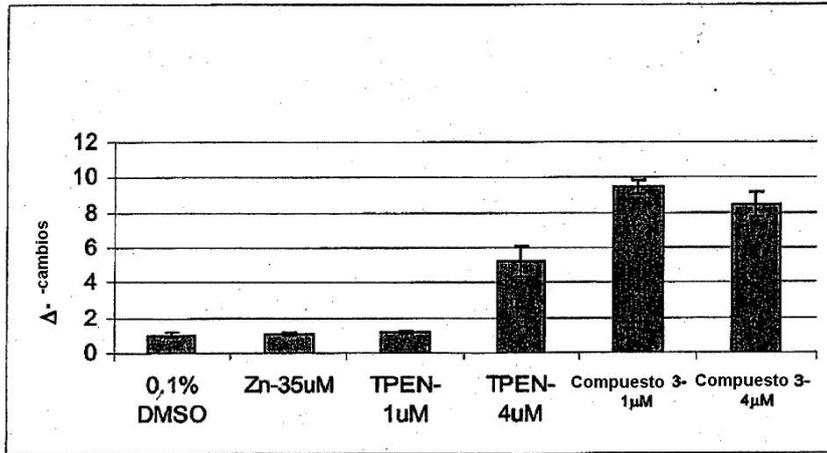


FIGURA 9

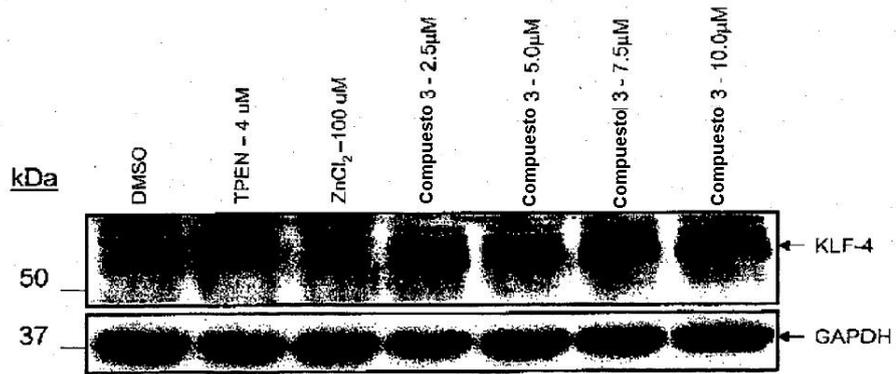


FIGURA 10

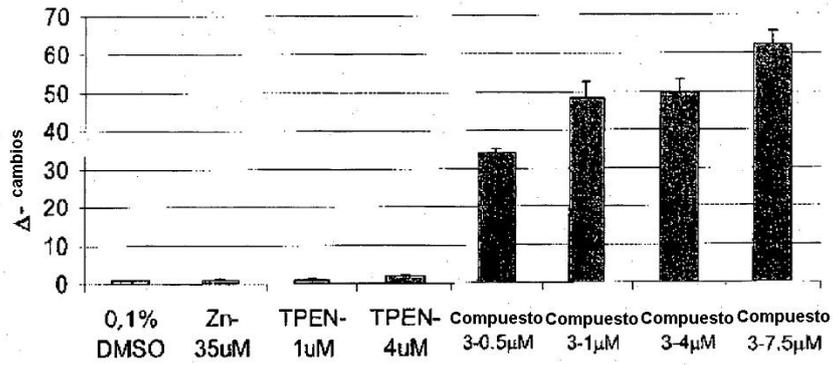
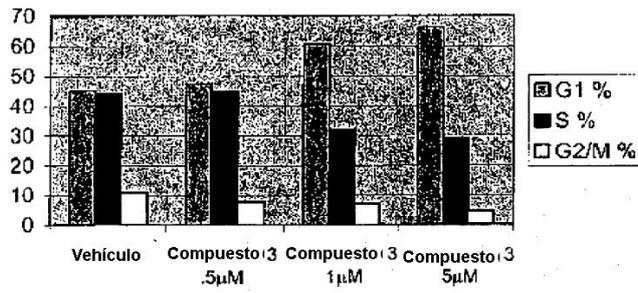


FIGURA 11

A.



B.

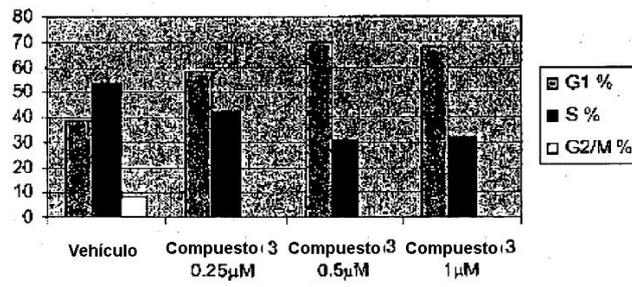


FIGURA 12

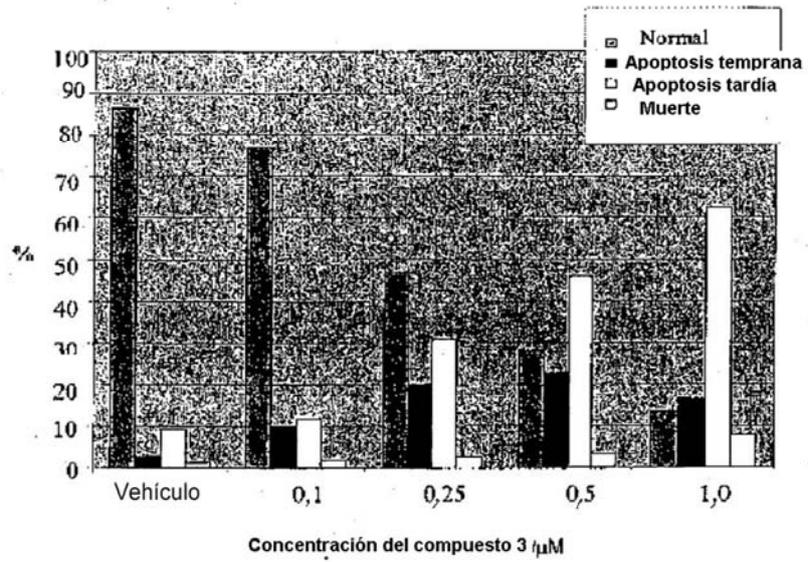
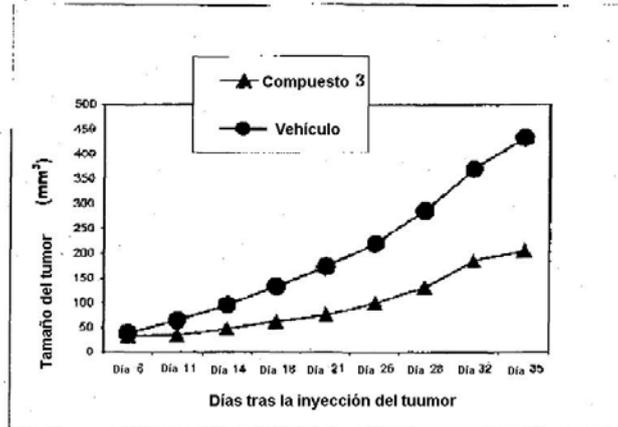


FIGURA 13

A.



B.

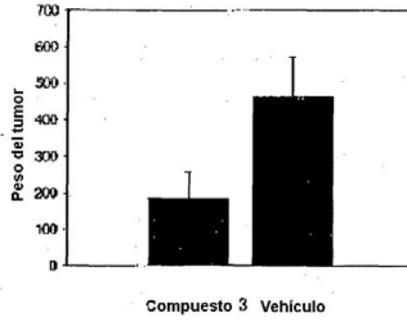


FIGURA 14

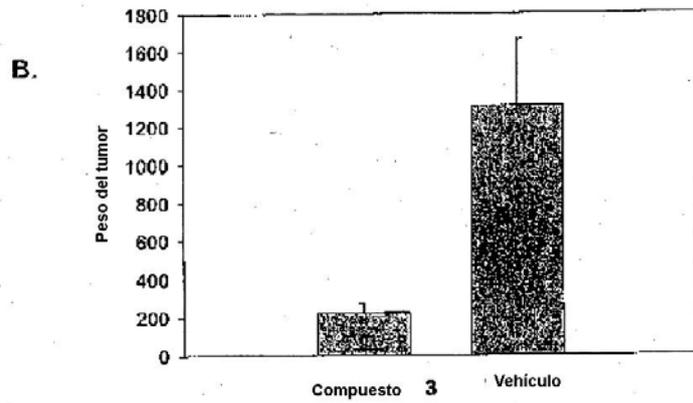
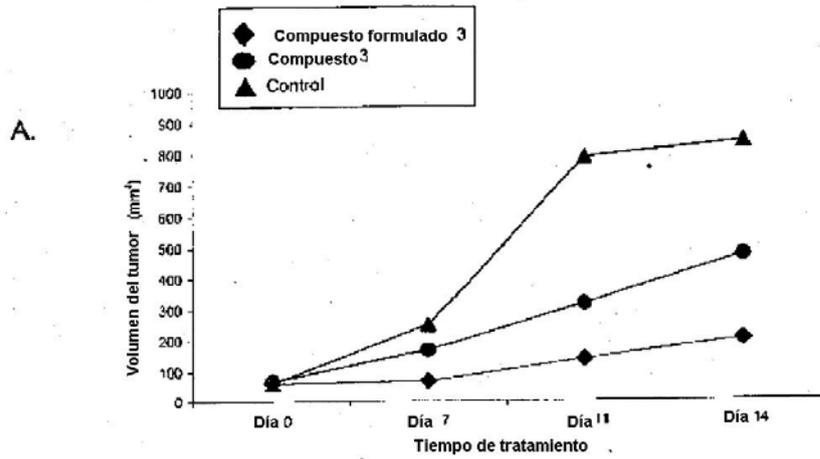
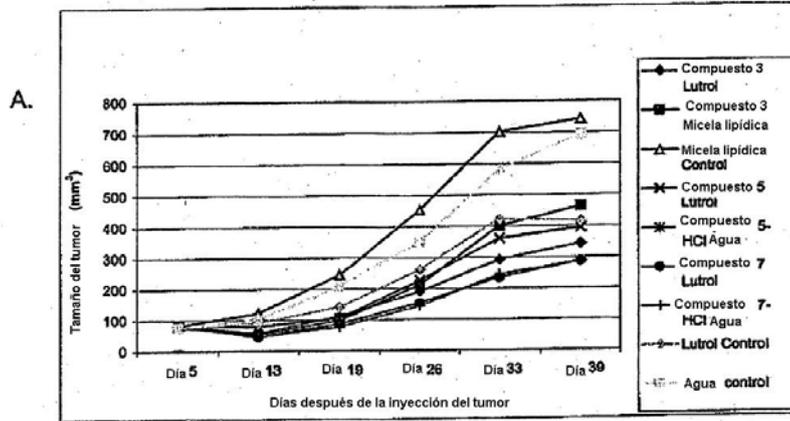


FIGURA 15



B.

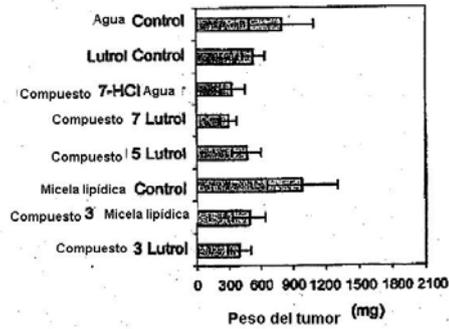
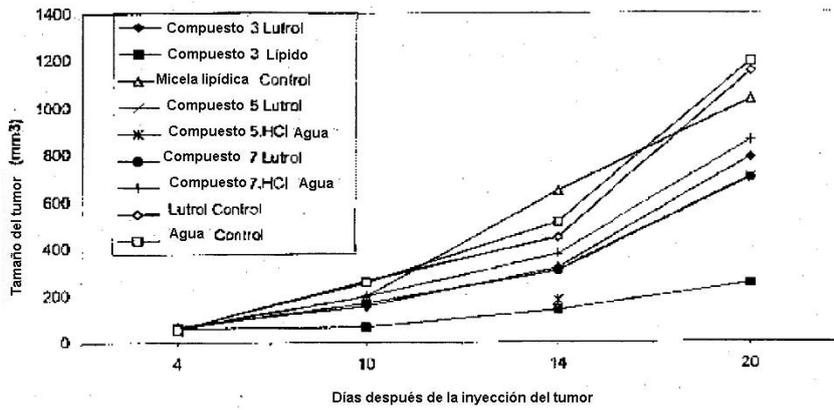


FIGURA 16

A.



B.

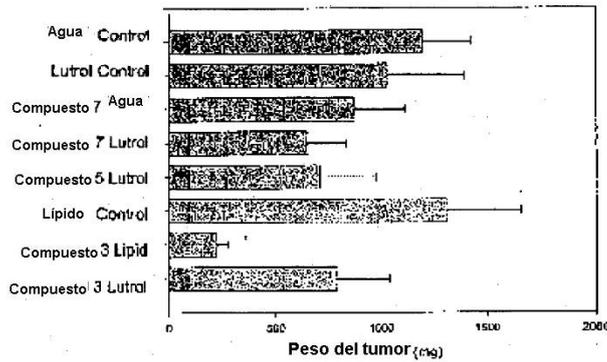


FIGURA 17

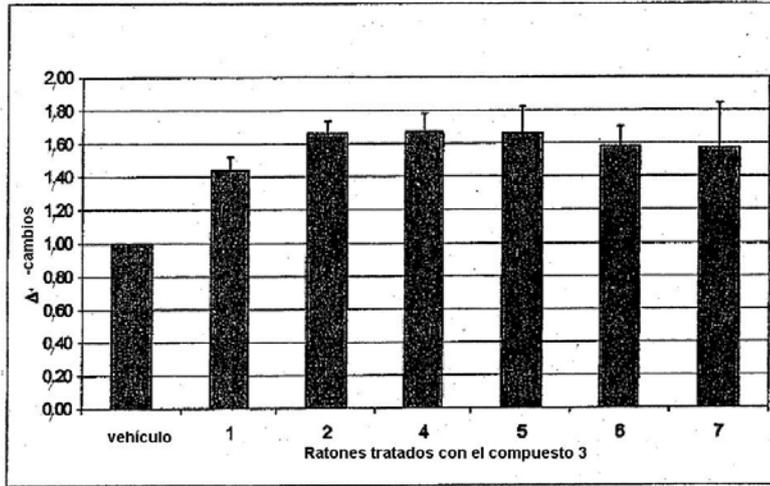


FIGURA 18

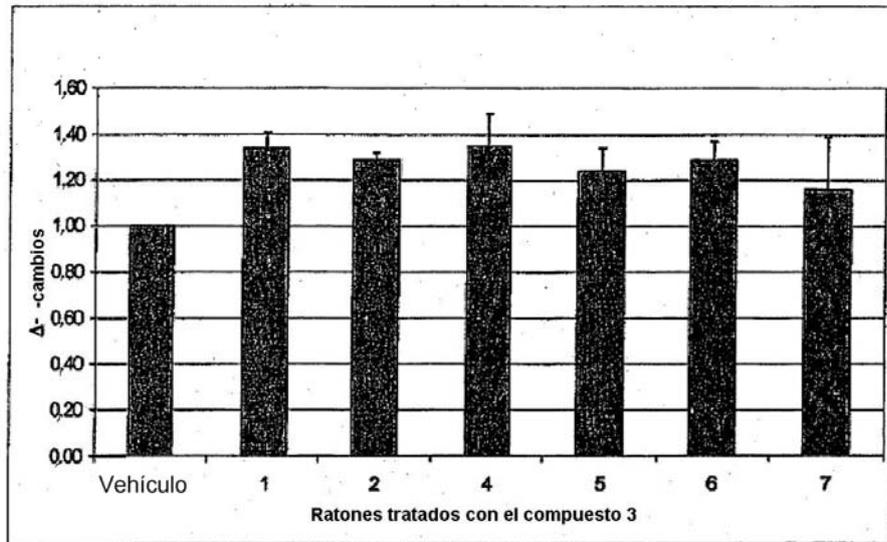


FIGURA 19

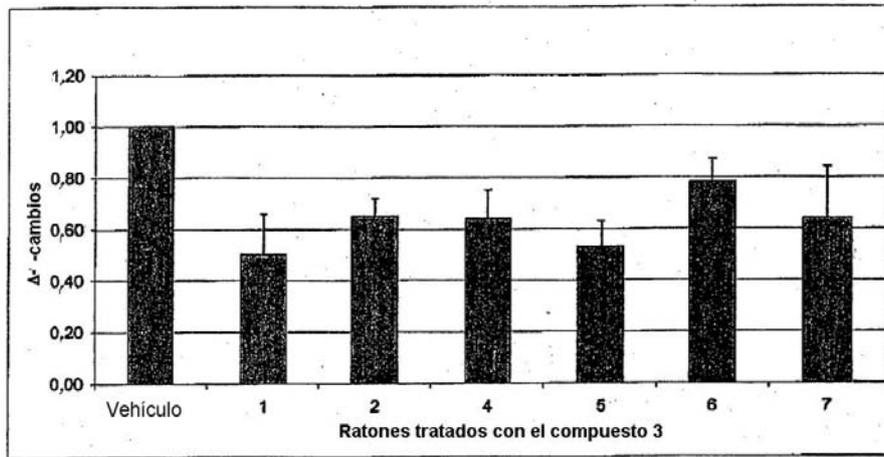


FIGURA 20

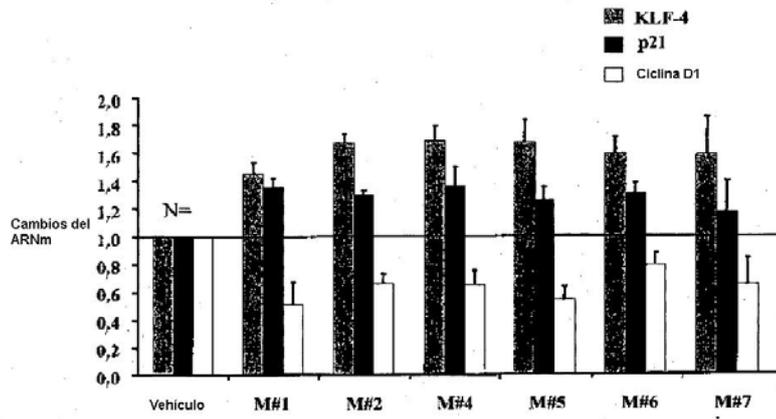


FIGURA 21

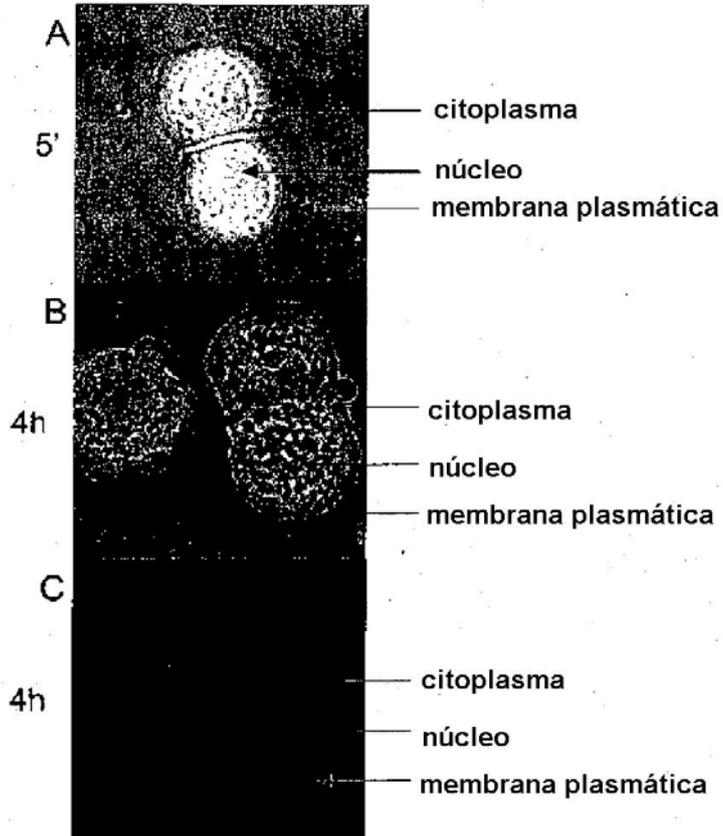


FIGURA 22

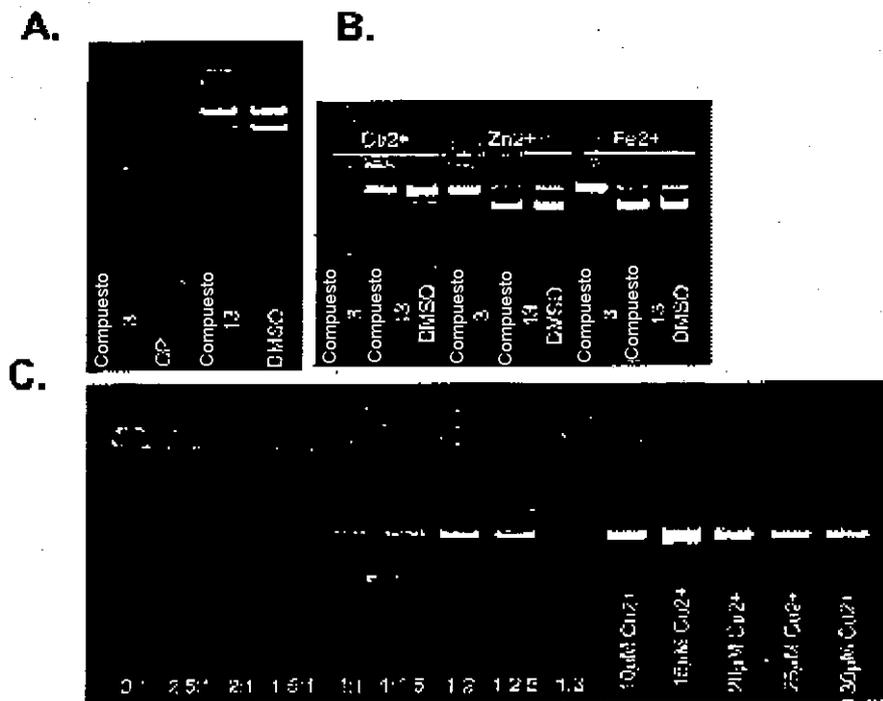


FIGURA 23

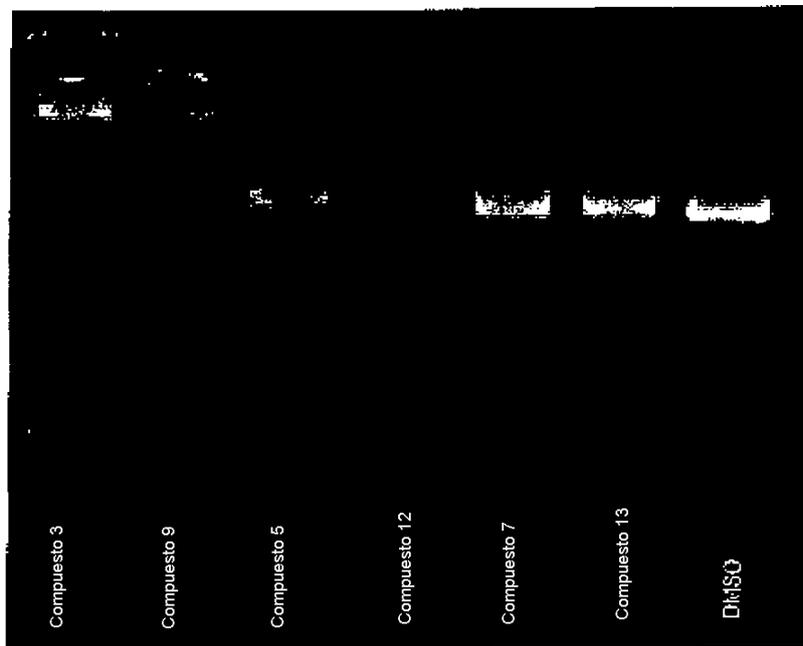


FIGURA 24

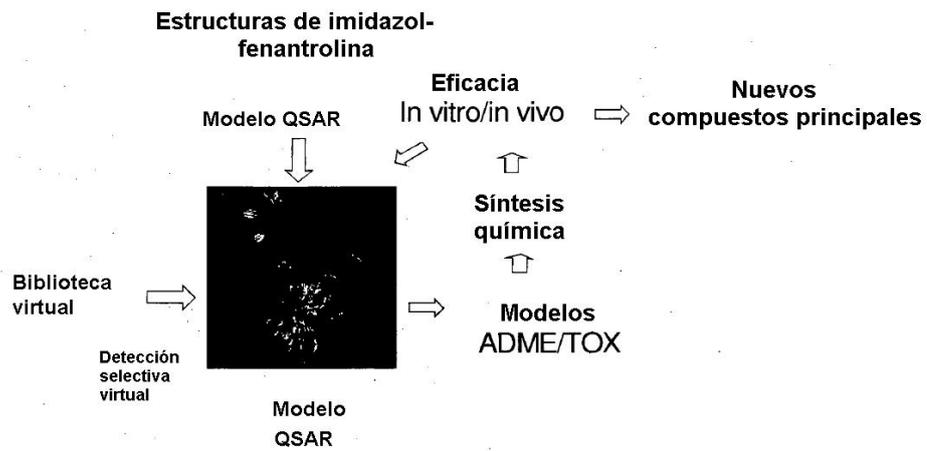


FIGURA 25

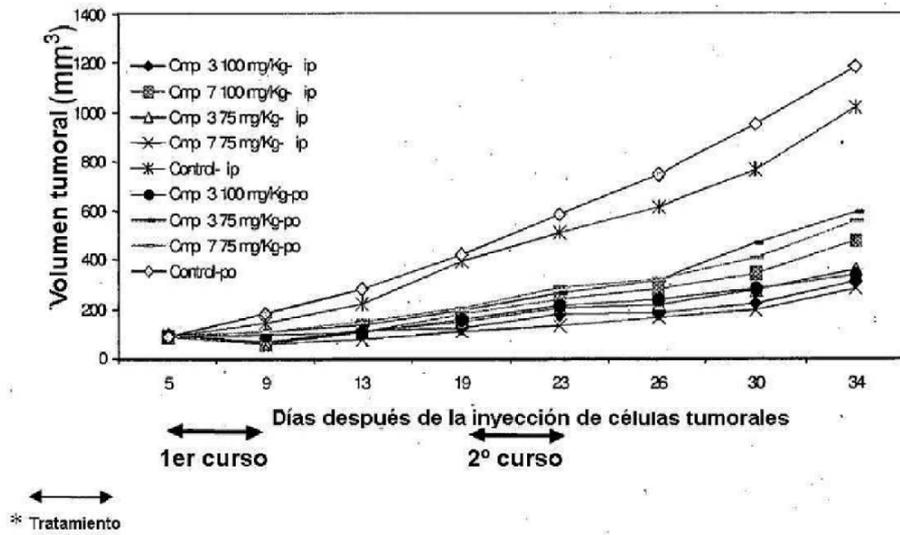
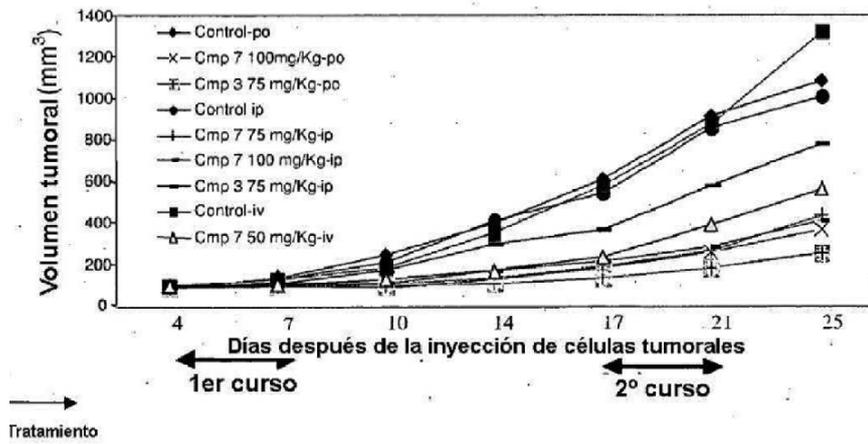
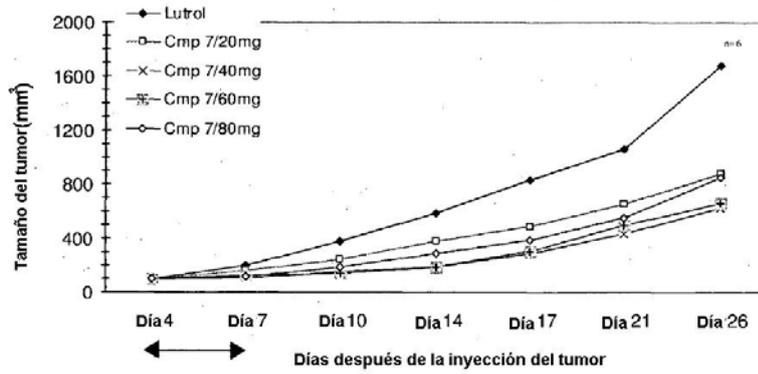


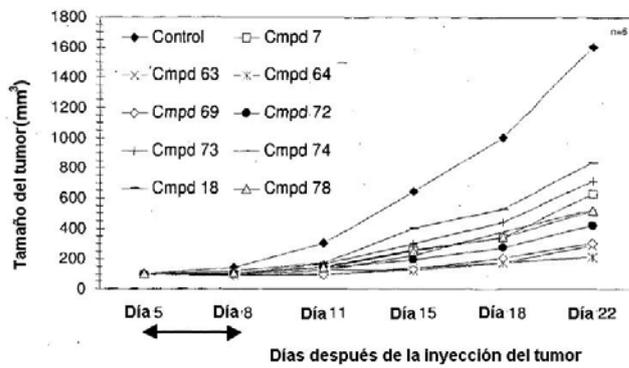
FIGURA 25 continuación

C.



* Tratamiento

D.



* Tratamiento

FIGURA 26

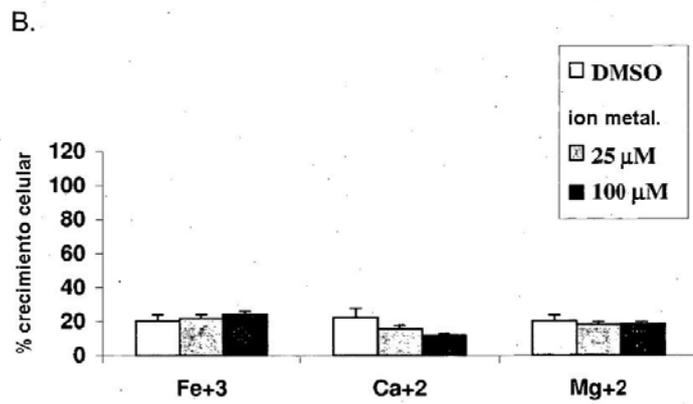
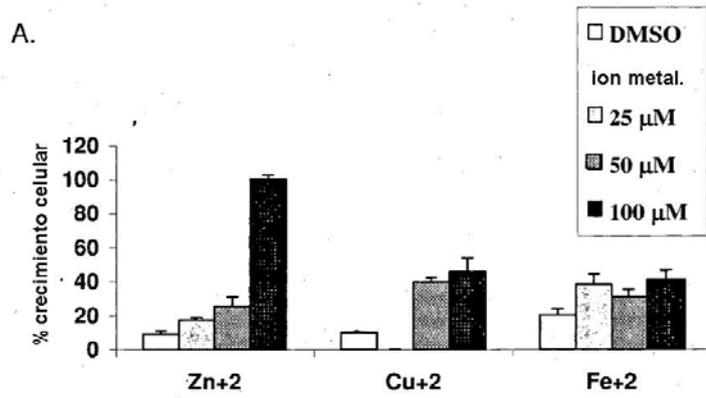
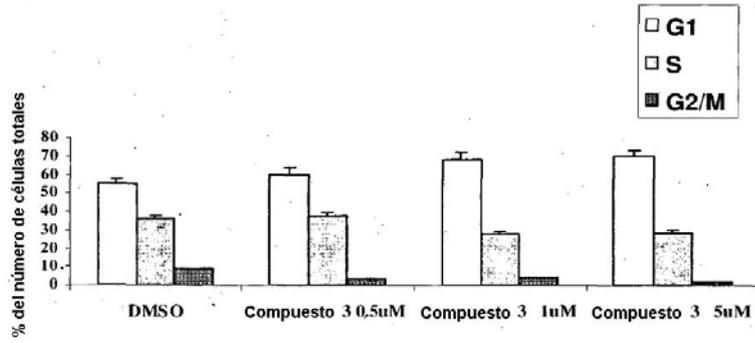


FIGURA 27

A.



B.

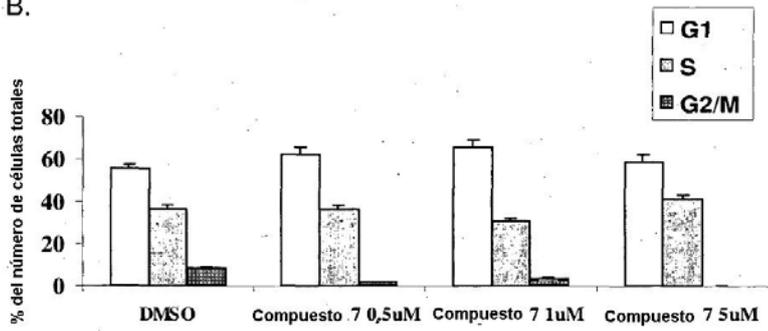


FIGURA 28

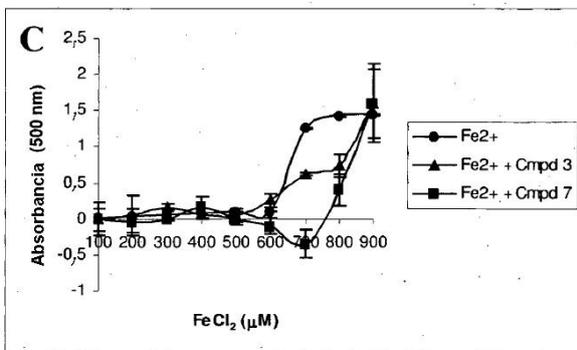
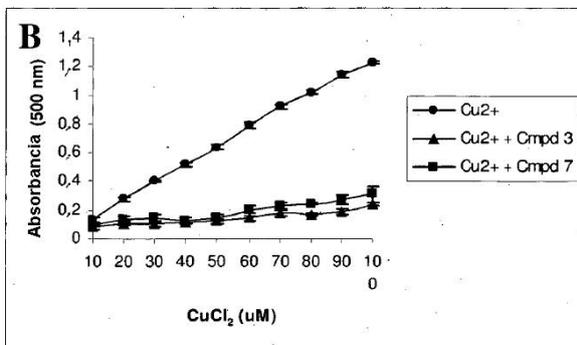
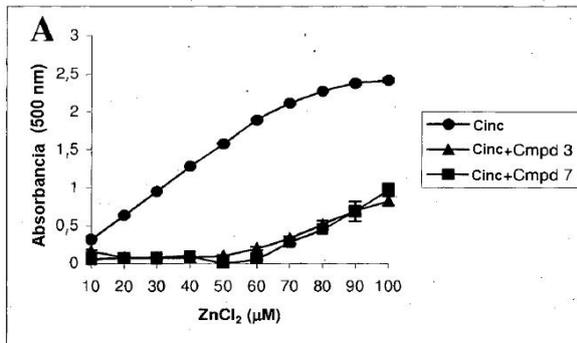


FIGURA 29

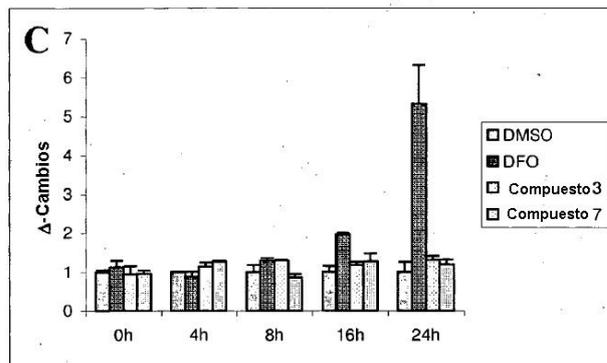
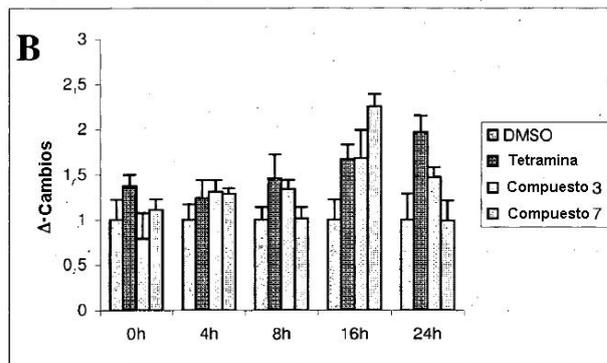
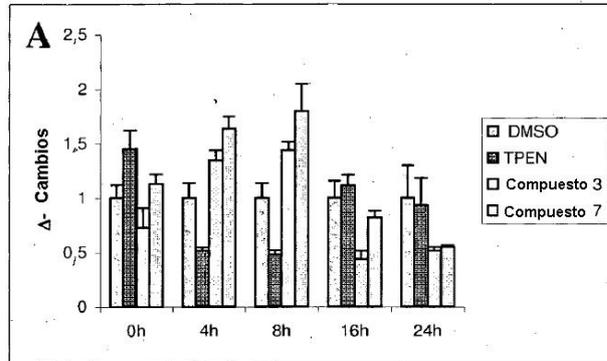
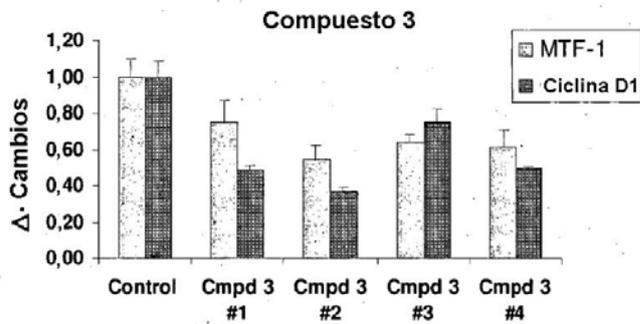


FIGURA 30

A.



B.



C.

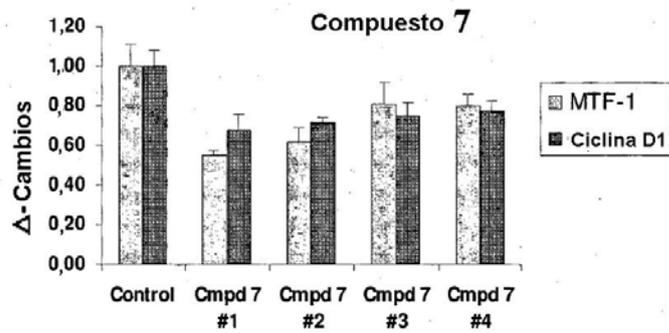


FIGURA 31

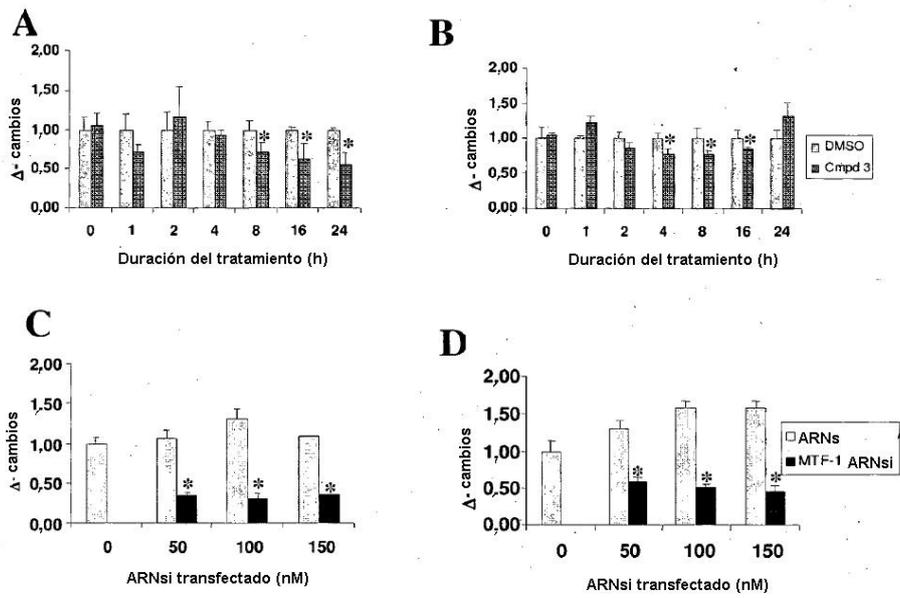


FIGURA 32

A

región promotora del gen KLF4

-322 -291

5' AACCTGCGCCCGGTTCTCGCGCCCCGCGCTG 3'

TGCGCCC

MTF-1

GCGCCCG

Sp1/KLF4

GCGCCCC

Sp1/KLF4

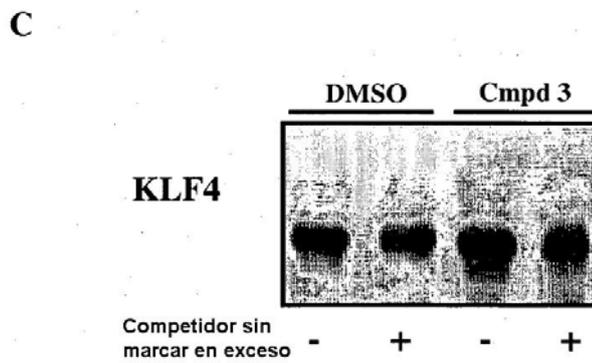
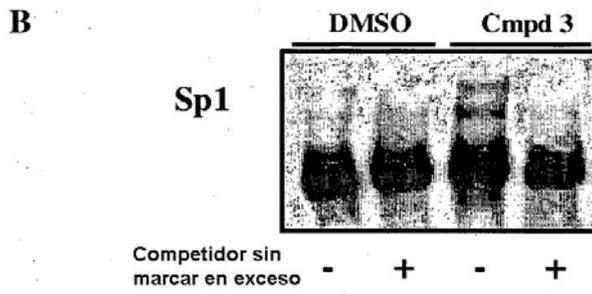
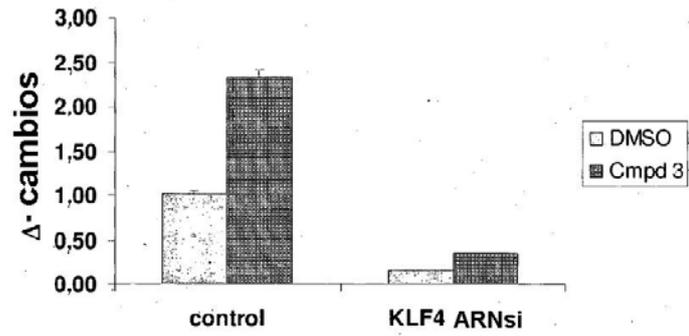


FIGURA 34

A



B

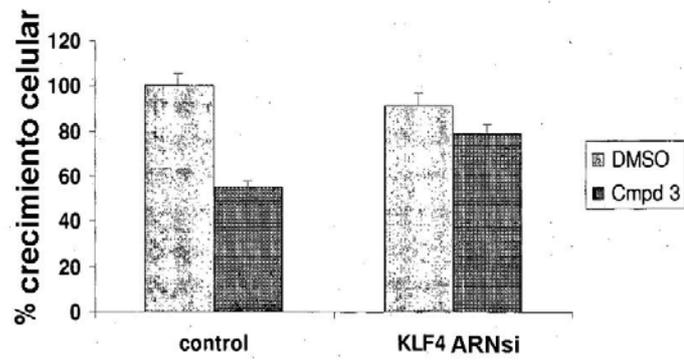


FIGURA 35

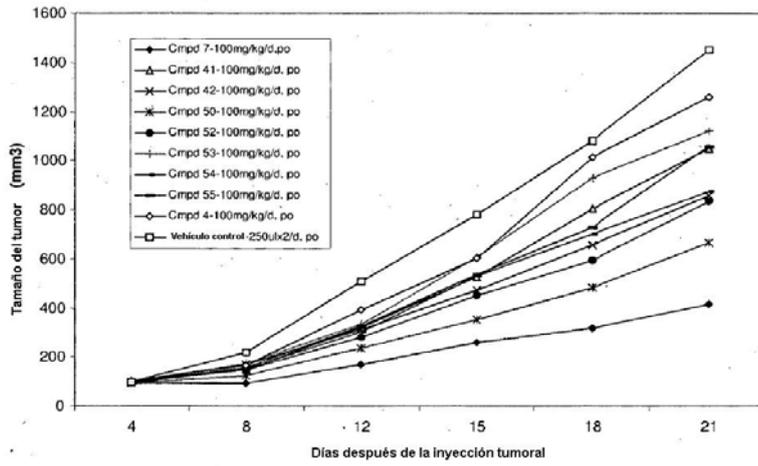


FIGURA 36

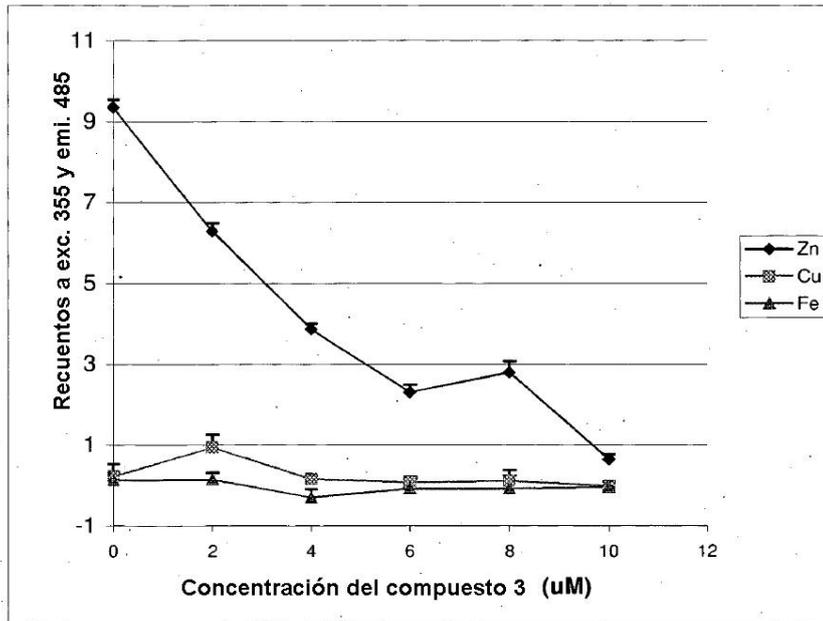
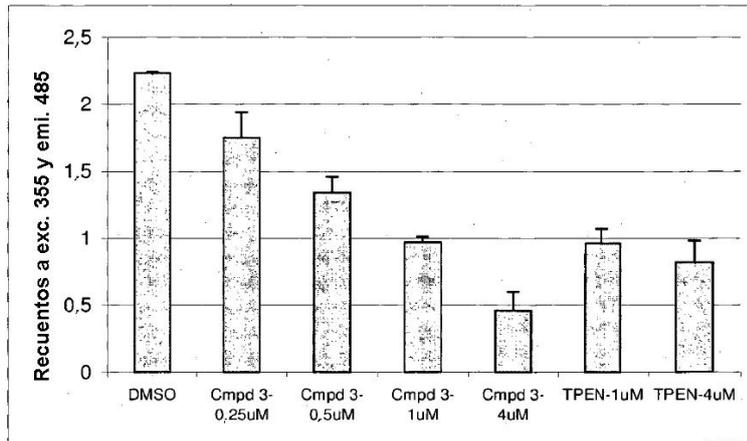


FIGURA 37

A.



B.

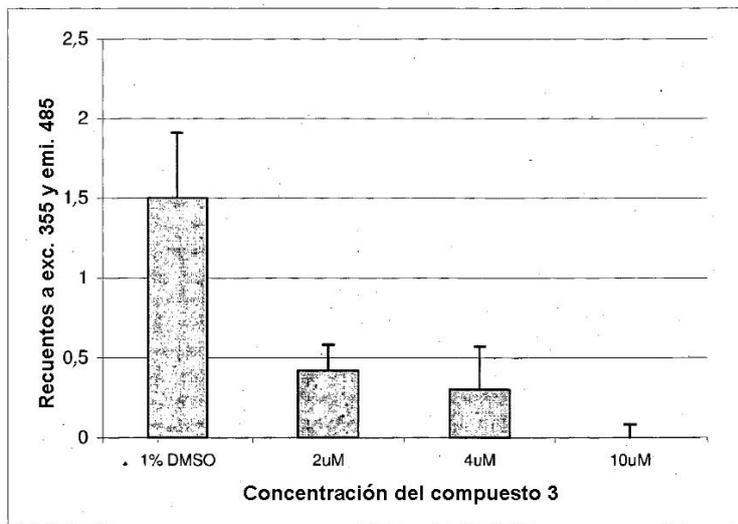
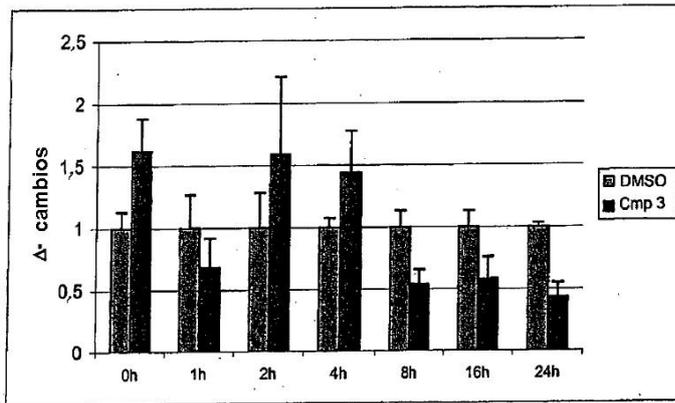


FIGURA 38

A.



B.

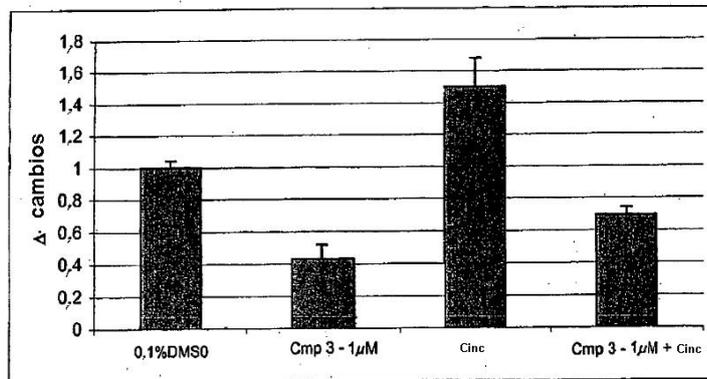
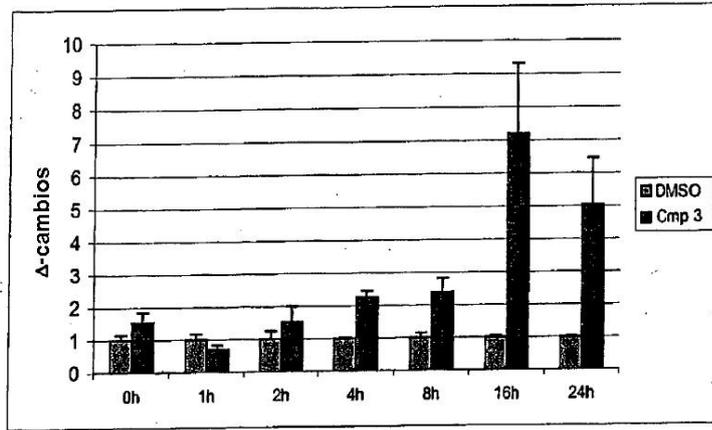


FIGURA 39

A.



B.

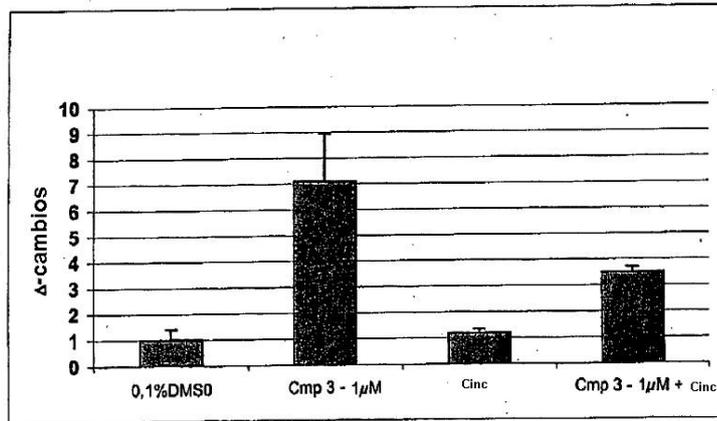
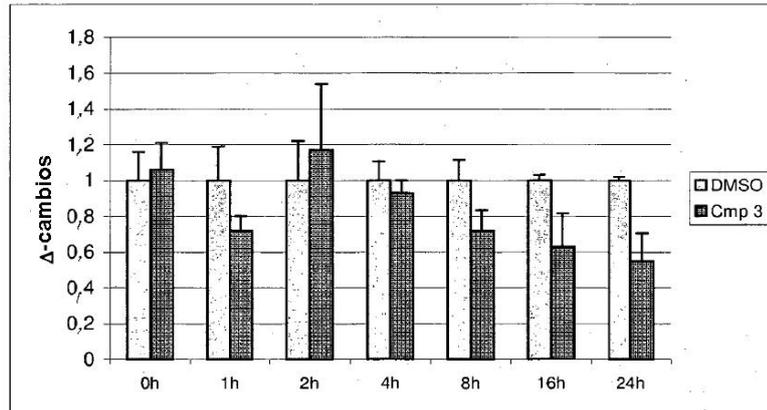


FIGURA 40

A.



B.

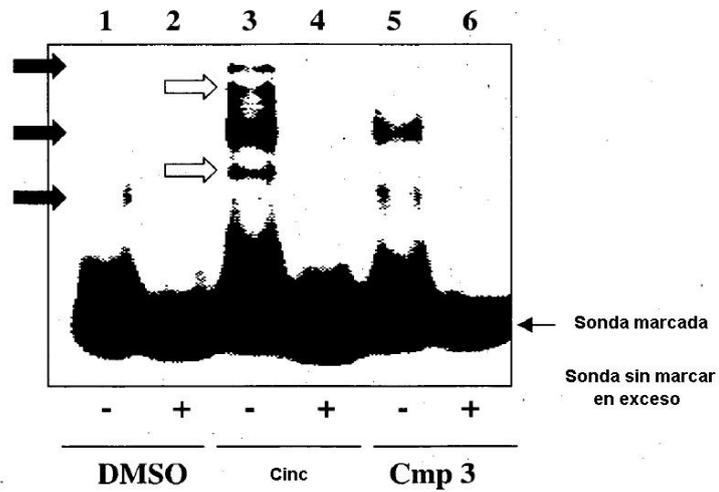
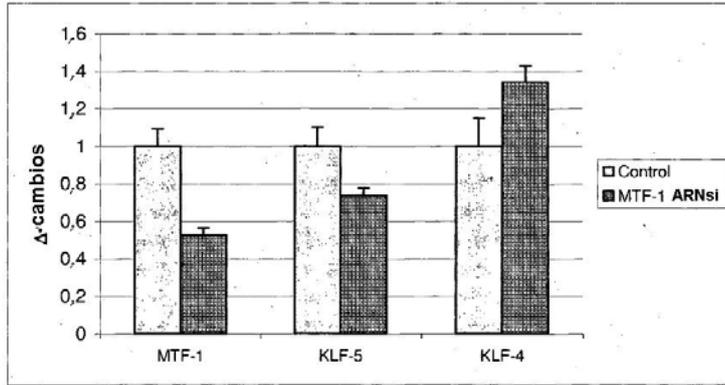


FIGURA 41

A.



B.

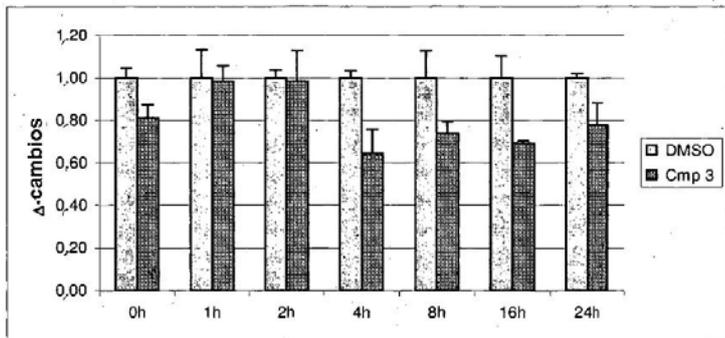
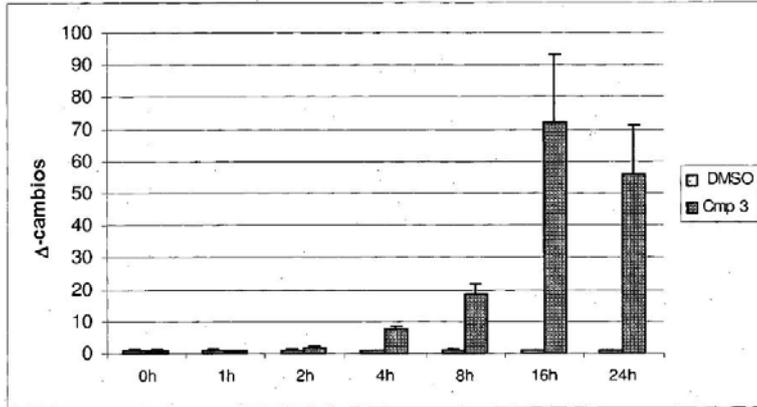


FIGURA 42

A.



B.

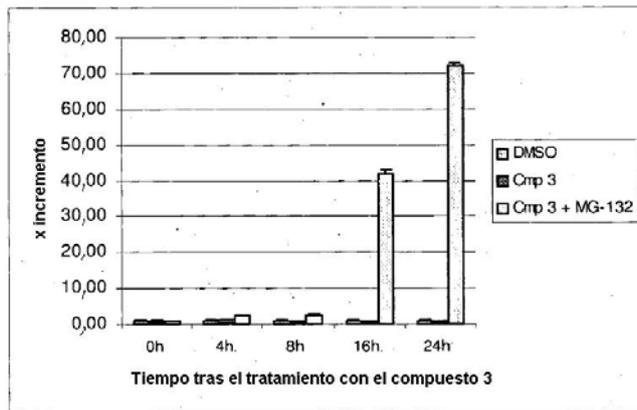
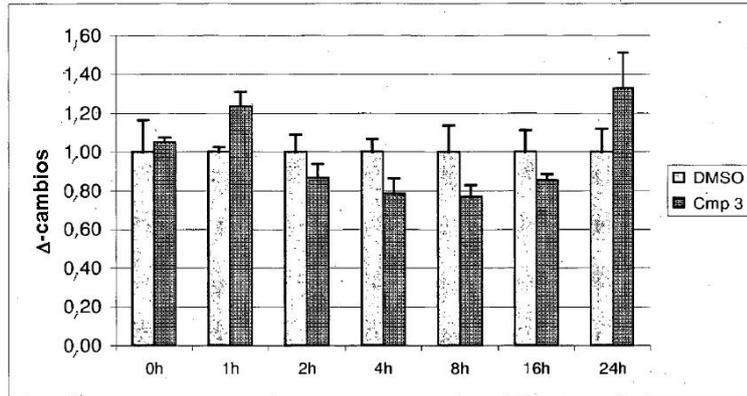


FIGURA 43

A.



B.

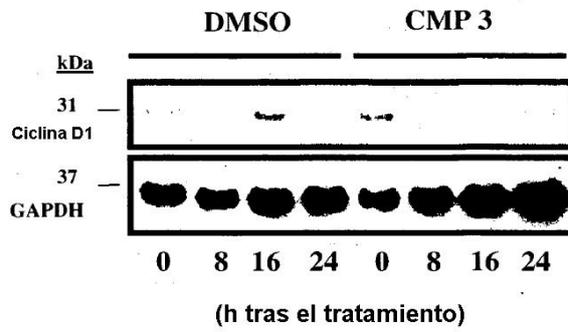
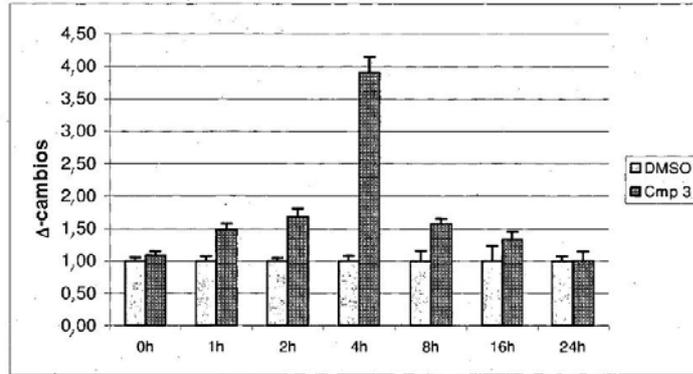


FIGURA 44

A.



B.

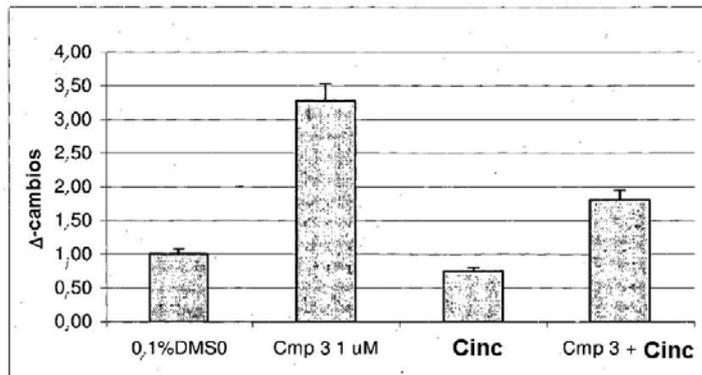


FIGURA 45

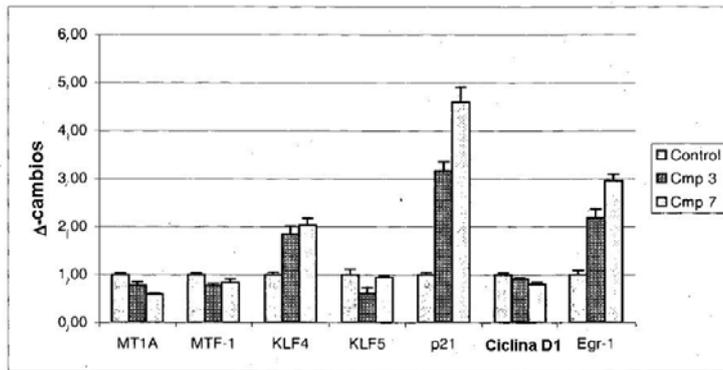


FIGURA 46

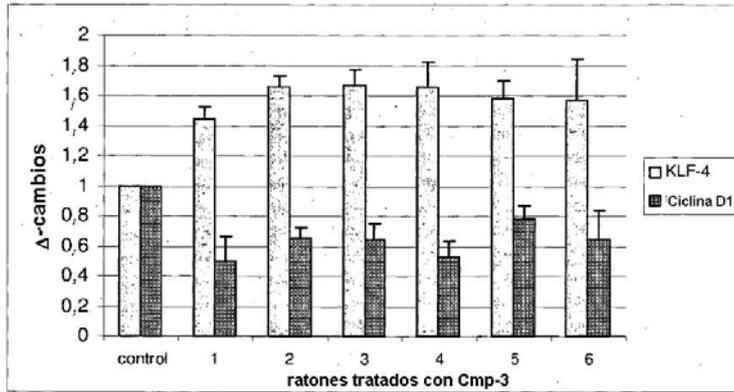


FIGURA 47

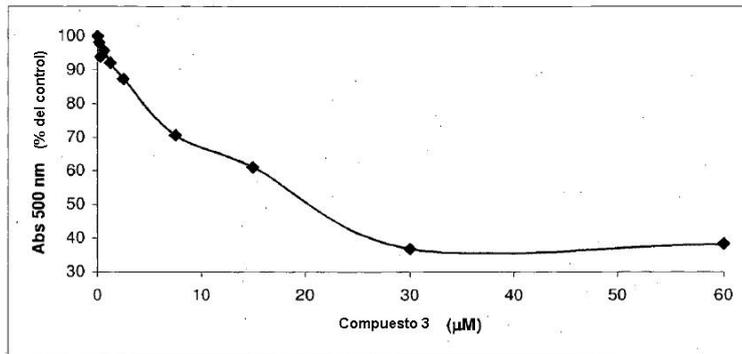


FIGURA 48

A.

Compuesto 3 (μM)			
0	5	10	0

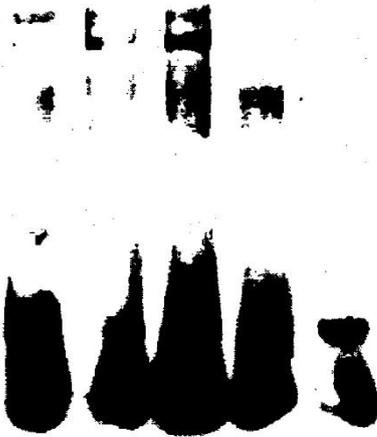


Competidor sin marcar
en exceso

- - - +

B.

DMSO	Compuesto 3			
	1 h	2 h	4 h	1 h



Competidor sin marcar
en exceso

- - - - +

FIGURA 49

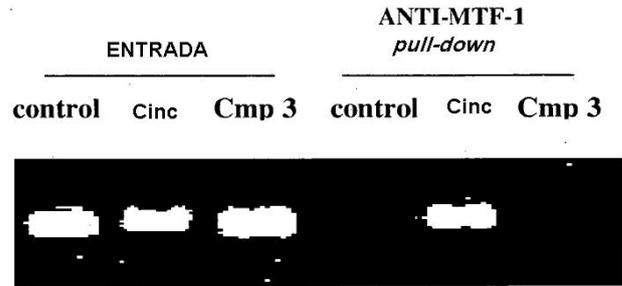
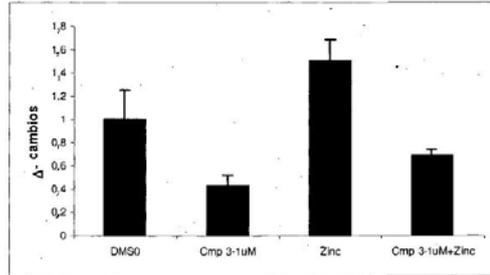


FIGURA 50

A.



B.

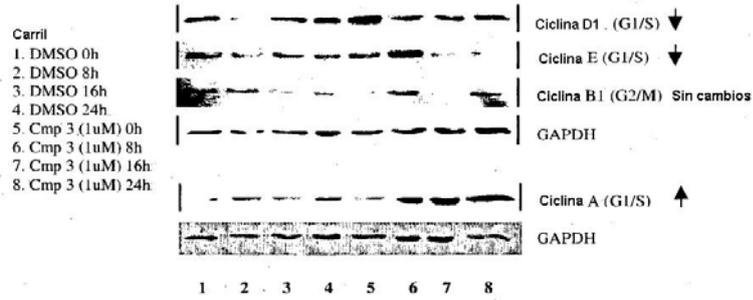
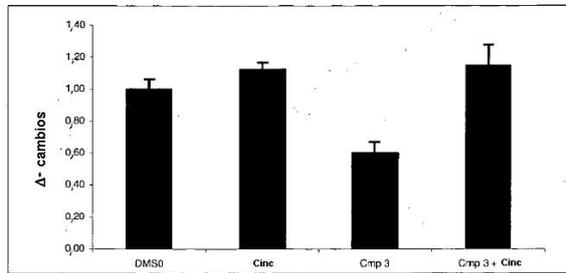
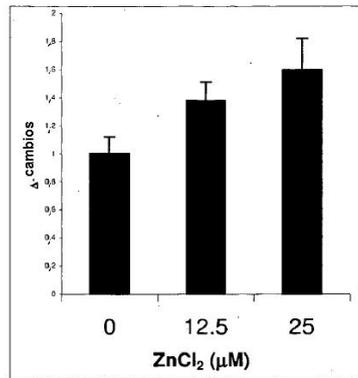


FIGURA 51

A.



B.



C.

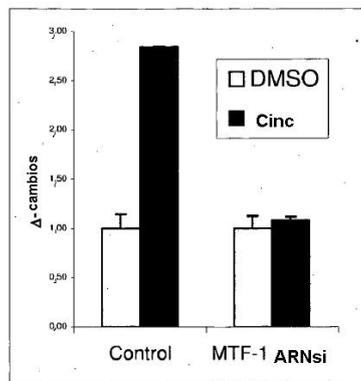


FIGURA 52

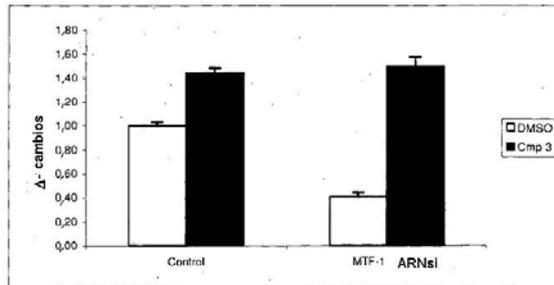
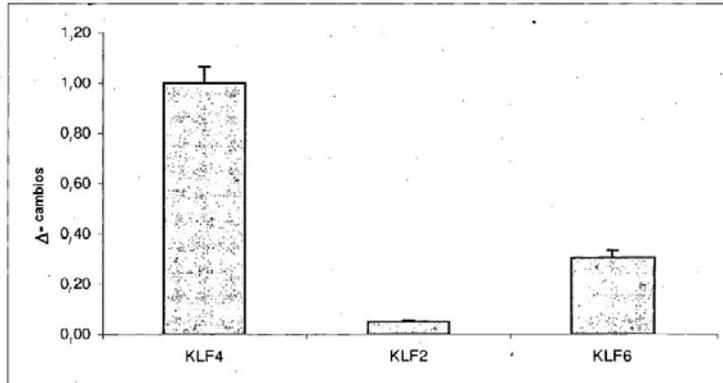


FIGURA 53

A.



B.

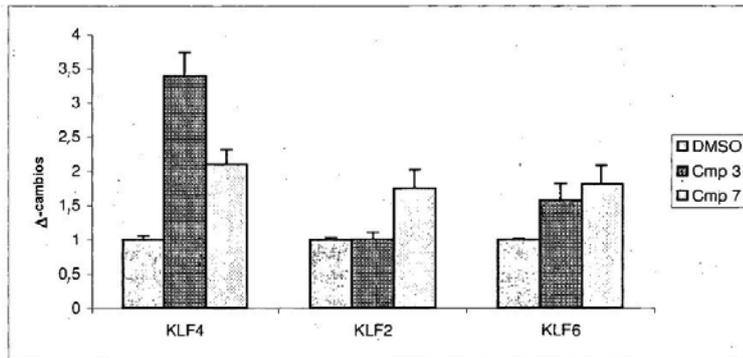
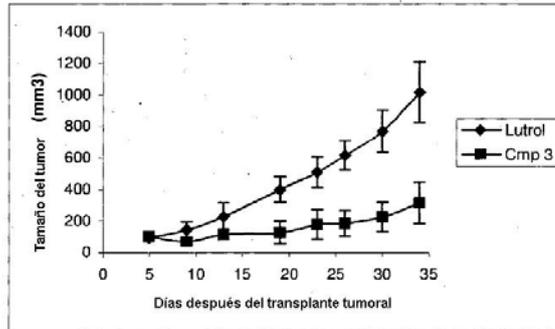


FIGURA 54

A.



B.

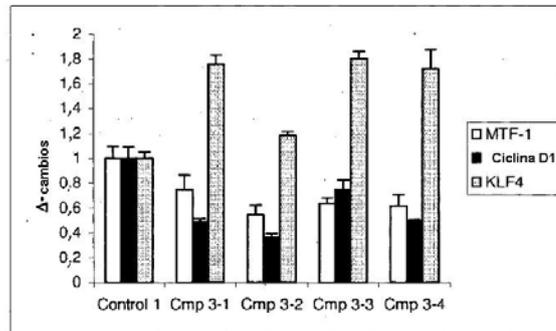


FIGURA 55

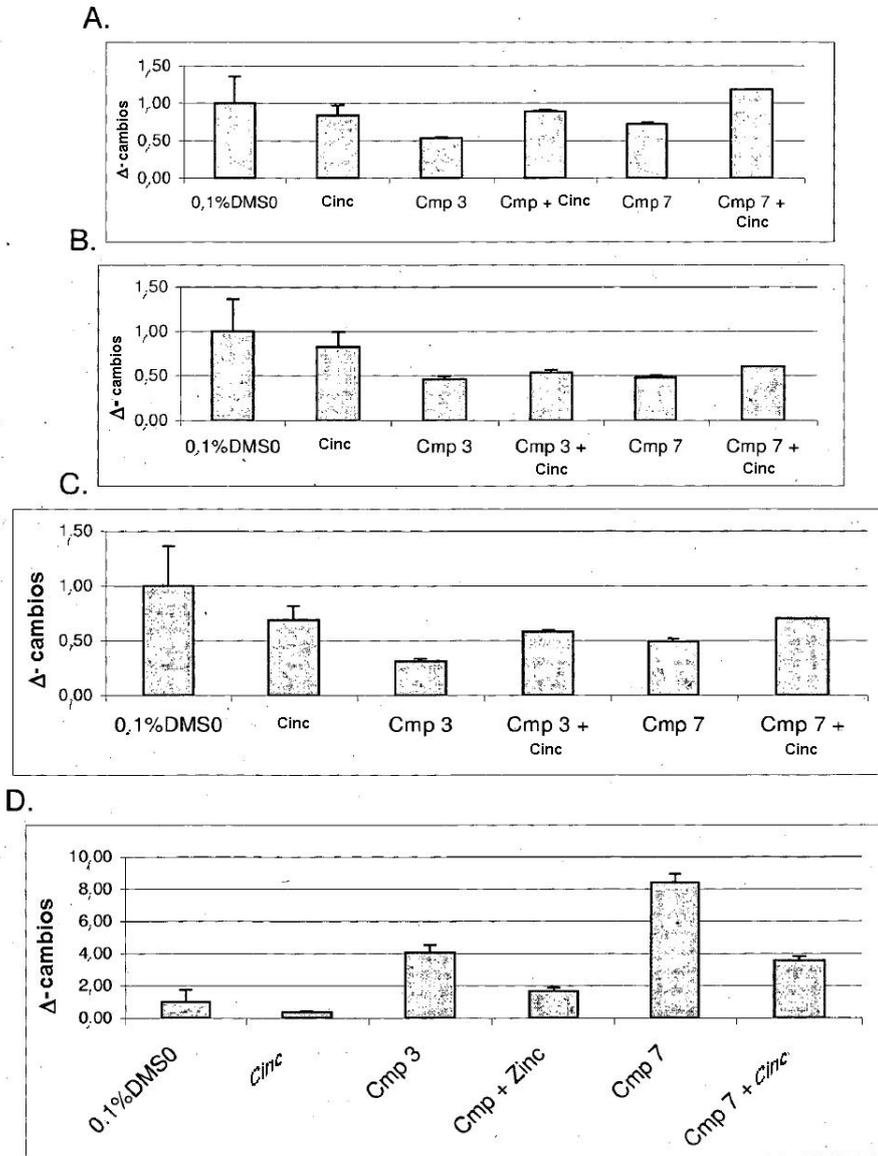
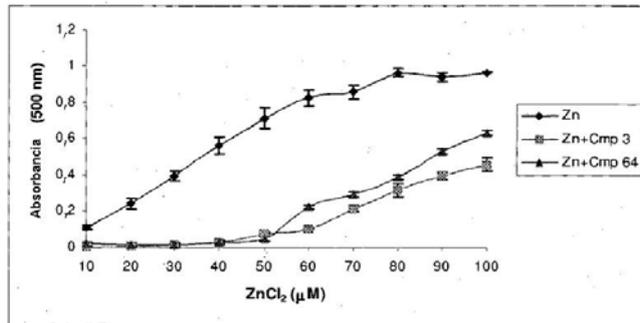
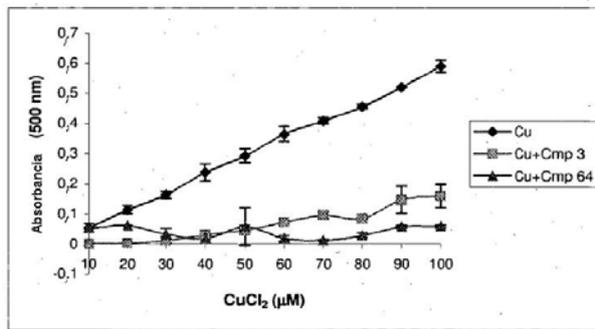


FIGURA 56

A.



B.



C.

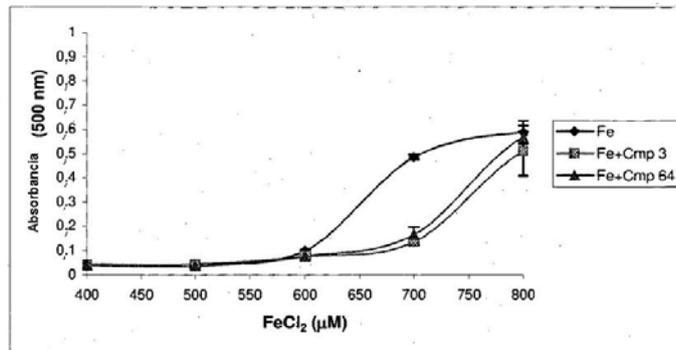


FIGURA 57

