

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 493**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/4725 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2009 E 09777548 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2306995**

54 Título: **Propiedades antitumorales de inhibidores de proteasa modificados con NO**

30 Prioridad:

01.08.2008 US 85555

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

17.10.2014

73 Titular/es:

**ONCONOX APS (100.0%)
Ole Maaløes Vej 3
Copenhagen, DK**

72 Inventor/es:

**NICOLETTI, FERDINANDO;
AL-ABED, YOUSEF y
GAROTTA, GIANNI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 509 493 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

Propiedades antitumorales de inhibidores de proteasa modificados con NO

La presente invención se refiere al éster nítrico de los inhibidores de la proteasa del VIH, en particular de Saquinavir, y a su uso en terapia humana

5 **Antecedentes de la invención**

Los inhibidores de la proteasa del VIH (IP-VIH) son agentes antirretrovirales aprobados para uso en seres humanos desde 1993. Los IP-VIH están diseñados para unirse al sitio catalítico de la proteasa del VIH de forma selectiva y, por lo tanto, bloquear la replicación y la producción de partículas virales infecciosas (Deeks et al 1997). Se ha demostrado que estos fármacos afectaban a varios procesos celulares importantes, tales como la angiogénesis, inflamación, procesamiento y presentación de antígenos, la supervivencia celular y la remodelación de tejidos (Sgadari et al. 2003, Andre et al. 1998, Gruber et al. 2001, Delmonte et al. 2007). Pruebas recientes indicaron una fuerte capacidad anticancerosa de los IP-VIH tanto *in vitro* como *in vivo*. La inhibición del crecimiento de diferentes células tumorales se acompañó de la inducción de la muerte celular apoptótica (Chow et al. 2006, Pajonk et al. 2002, Ikezoe et al. 2004, Ikezoe et al. 2000, Gills et al. 2007). A pesar de que los mecanismos de acción de estos fármacos no están estrictamente definidas, sus objetivos potenciales son: AKT, la señal extracelular de quinasa regulada, factor-kB nuclear, transductores y activadores de la transcripción 3, metaloproteinasas de la matriz, el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Pajonk et al. 2002, Ikezoe et al. 2004, Sgadari et al. 2002, Ikezoe et al. 2004, Gupta et al. 2005, Cuneo et al. 2007). Por otra parte, se ha demostrado que estos fármacos sensibilizan a las células tumorales a la radiación, mejoran los efectos anticancerosos de otros fármacos citostáticos y, también, inhiben el crecimiento y la invasión de las células tumorales angiogénicas en ratones atímicos (Ikezoe et al., 2004, Sgadari et al. 2002, Gupta et al. 2005).

Desafortunadamente, a la aplicación de estos fármacos le siguieron muchos efectos imprevistos y adversos tales como hiper o hipolipidemia, enfermedades cardiovasculares, diabetes, redistribución de la grasa corporal, osteopenia y osteoporosis (Flexner, 1998). La adición del resto de NO es uno de los enfoques actuales empleados con el fin de reducir la toxicidad y mejorar la eficacia del fármaco. Este tipo de modificación química se aplicó sobre numerosos medicamentos antiinflamatorios no esteroideos.

Descripción de la invención

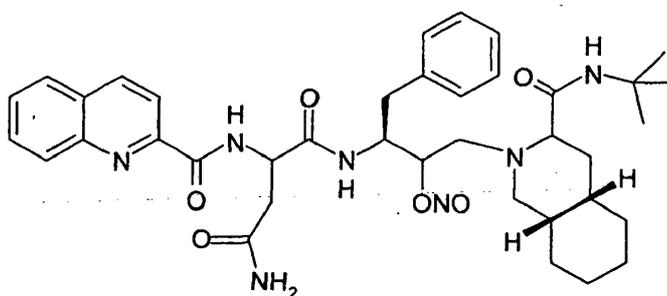
En la actualidad se ha encontrado que los inhibidores de la proteasa del VIH, particularmente saquinavir, pueden modificarse ventajosamente mediante unión covalente de NO.

30 En consecuencia, la invención proporciona ésteres nítricos de los inhibidores de la proteasa del VIH.

El resto de NO se introduce en el grupo hidroxilo presente en los inhibidores de la proteasa conocidos mediante procedimientos convencionales, es decir, mediante la reacción con ácido nítrico concentrado en anhídrido acético / hidrocarburo halogenado a temperaturas inferiores a 0 °C, preferentemente inferiores a -10 °C

35 Los inhibidores de la proteasa que, además de Saquinavir, están esterificados ventajosamente con ácido nítrico, incluyen ritonavir y nelfinavir.

El éster nítrico de Saquinavir es particularmente preferido, teniendo la fórmula I



Saquinavir-NO

40

así como sus sales no tóxicas, solvatos o formas polimórficas cristalinas.

Se descubrió que el compuesto de fórmula I, en lo sucesivo en el presente documento denominado NO-saquinavir, era más eficaz y menos tóxico que el compuesto saquinavir de la patente, como se mostrará en la parte experimental que se expone a continuación.

El esquema de síntesis del compuesto I se indica en la Figura 1.

- 5 La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de fórmula I u otro éster nítrico de los inhibidores de la proteasa del VIH como se define en la reivindicación 1, mezclado con vehículos/excipientes adecuados. Las composiciones de la invención pueden administrarse por cualquier vía conocida, en particular por vía oral, parenteral, tópica, transdérmica, rectal.

- 10 El experto en la materia determinará fácilmente la dosis de acuerdo con las propiedades toxicológicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas, así como de acuerdo con las condiciones de los pacientes (gravedad de la enfermedad y el grado de avance), el peso, la edad y el sexo. Las dosificaciones serán en general similares a lo ya conocido en la práctica clínica para el compuesto saquinavir parental o para los correspondientes inhibidores de la proteasa parental.

Dichas composiciones son útiles para el tratamiento de tumores y de infecciones por VIH.

- 15 En consecuencia, la invención proporciona también tratamiento de pacientes afectados por tumores y / o infecciones de VIH que comprenden la administración a dichos pacientes de una cantidad eficaz del compuesto de la reivindicación 1.

Los ejemplos siguientes describen la invención con detalle.

Ejemplo 1 Síntesis de Saquinavir-NO

- 20 A una mezcla en agitación de ácido nítrico fumante ($\geq 90\%$ HNO_3 , 1 ml, 23,6 mmol) y Ac_2O (3,5 ml, 37,1 mmol) a -10°C se añadió saquinavir (3 g, 4,48 mmol) en CHCl_3 (18 ml) y después se calentó lentamente hasta la temperatura ambiente en dos horas en nitrógeno. La mezcla de reacción se inactivó con agua enfriada con hielo y se extrajo con CH_2Cl_2 . Los extractos se lavaron con NaHCO_3 saturado enfriada con hielo y agua, se secaron con MgSO_4 y se filtraron. El disolvente se evaporó a presión y el producto bruto se purificó mediante FCC eluyendo con 3: 2 a 3: 3
25 Hex: Acetona. El producto obtenido se recristalizó en EtOAc / Hex para dar el Saquinavir-ONO₂ (1,7 g, 53%) como un sólido blanco y la pureza se analizó mediante HPLC y EM-EM m/z 716,33 ($\text{M} + \text{H}^+$).

HPLC: Tipo de columna: Phenomenex Primesphere 5 C18 MC 110A 250 x 4,6 mm

Longitud de onda de detección: 275 nm (longitud de onda máxima de absorbancia).

Caudal: 1 ml / min con un gradiente lineal de agua (0,1% AcOH):

- 30 MeOH [90:10] en agua (0,1 % AcOH): MeOH [10:90] en 30 min

Ejemplo 2 - Caracterización biológica

Materiales y procedimientos

Reactivos y células

- 35 Naranja de acridina (AO) se obtuvo de Labo-Moderna (París, Francia). El éster de diacetato succinimidil carboxifluoresceína (CFSE) era de Molecular Probes (Eugene, EE.UU.). El inhibidor de Akt VI se obtuvo de Calbiochem (Alemania). Todos los demás productos químicos se adquirieron en Sigma (St. Louis, EE.UU.) a menos que se especifique lo contrario. Saquinavir (SAQ, PM 670 g / l) y Saquinavir-NO (SAQ-NO, PM 715 g / l) se almacenaron a -20°C a una concentración de 5 mg / ml en 25% de dimetilsulfóxido (DMSO) en RPMI 1640 - 5% de FCS, y se diluyeron en medio de cultivo inmediatamente antes de su uso. Los cultivos de células de control se
40 trataron con un volumen adecuado de DMSO.

- Las líneas celulares de glioma C6 de rata y de glioblastoma U251 humano fueron un regalo del doctor Pedro Tranque (Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, España), el melanoma murino B16 y el adenocarcinoma humano HeLa fueron un regalo del doctor Sinisa Radulovic (Instituto de Oncología y Radiología de Serbia, Belgrado, Serbia), mientras que el fibrosarcoma de ratón L929 se obtuvo de la Colección Europea de Cultivos Celulares
45 Animales (Salisbury, Reino Unido). Las células HCC1419 de mama y PC-3 de próstata humano se adquirieron en LGC Promochem srl (Venecia, Italia). Los fibroblastos de ratón primarios y los astrocitos de rata se prepararon como se ha descrito (Mijatovic et al., 2004). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 tamponado con HEPES suplementado con 5% de FCS, glutamina 2 mM, 0,01% de piruvato de sodio, $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 2-mercaptoetanol, y antibióticos (medio de cultivo) a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 . Después del procedimiento
50 de tripsinización convencional, las células se sembraron a 1×10^4 pocillo en placas de 96 pocillos a 2×10^5 pocillo en placa de 6 pocillos o 3×10^4 pocillo en un portaobjetos de cámara de 4 pocillos, se cultivaron durante la noche y se expusieron al fármaco. Ratones C57BL / 6 endogámicos de 2-3 meses de edad se obtuvieron de nuestras

instalaciones en el Biological Research "Sinisa Stankovic" y se mantuvieron en condiciones de laboratorio estándar (sin patógeno específico) con acceso libre a comida y agua. La manipulación de los animales y el protocolo del estudio estaban en conformidad con las directrices internacionales y autorizados por el Comité institucional local de Uso y Cuidado de animales.

5 *Determinación de la viabilidad celular mediante MTT, ensayo con cristal violeta y liberación de LDH*

La reducción de bromuro de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en formazán depende de la actividad mitocondrial de las células cultivadas, la absorción del colorante cristal violeta se correlaciona con el número de células vivas adherentes, mientras que la liberación de lactato deshidrogenasa citosólica (LDH) indica la interrupción de la integridad de la membrana característica de las células necróticas. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano en un volumen final de 200 µl de medio de cultivo que contienen diferentes agentes, y los ensayos se realizaron después de 24 h de incubación exactamente como se ha descrito previamente (Mijatovic et al. 2004, Decker et al., 1998). La producción dependiente de la mitocondria de formazán y la intensidad de cristal violeta absorbido por las células adherentes se evaluaron mediante un lector de microplacas automatizado a 570 nm, mientras que la conversión mediada por piruvato de 2,4-dinitrofenilhidrazina en precipitado de hidrazona visible en ensayo de LDH se midió a 492 nm. El % de citotoxicidad indicado por la liberación de LDH se calculó como: $(E - C) / (T - C) \times 100$, en la que E es la absorbancia experimental de cultivos celulares, C es la absorbancia control de medio de cultivo libre de células, y T es la absorbancia correspondiente a la máxima (100%) liberación de LDH de las células lisadas con Triton.

Determinación de la proliferación celular

20 La tasa de proliferación celular se verificó mediante análisis de citometría de flujo de las células marcadas con CFSE (Kang et al. 2005). El colorante CFSE es estable en el citoplasma más de 15 generaciones y la intensidad de la disminución de la fluorescencia después de cada división. Brevemente, las células desprendidas se tiñeron con CFSE 1,5 µM durante 15 min a 37 °C, se lavaron 2 veces, se sembraron en placas de 6 pocillos a 2×10^5 células / pocillo y después se expusieron a los fármacos. Después de 24 y 48 h de cultivo de células se trataron con tripsina y se lavaron 2 veces. Finalmente, las células se resuspendieron en PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. La emisión de fluorescencia verde se midió con un citómetro de (BD, Heidelberg, Alemania) y se analizó usando el software CellQuest.

Determinación de la muerte celular por apoptosis y autofagia

30 La muerte celular apoptótica se evaluó mediante citometría de flujo de la fragmentación del ADN en células teñidas con el pigmento yoduro (PI) de unión a ADN. Tras una incubación de 24 horas en placa de 6 pocillos, las células (2×10^5 / Pocillo) se desprendieron con tripsina, se lavaron y se fijaron en etanol al 70% a 4 °C durante 30 min. Después de lavar en PBS, las células se resuspendieron en PBS que contenía 1 mg / ml de RNasa y yoduro de propidio (40 µg / ml) y se mantuvieron a 37 °C en oscuridad durante 30 min. La fluorescencia roja se analizó con citómetro de flujo FACSCalibur (BD, Heidelberg, Alemania) y la distribución de las células entre las fases del ciclo celular se determinó con el software Cell Quest Pro (BD). Las células hipodiploides en el compartimento sub-G₀/ G₁ se consideraron apoptóticas.

40 Se utilizó el colorante vital naranja de acridina (AO) para la detección de la autofagia. La intensidad de LA fluorescencia de color rojo se correlaciona con la acidez y el volumen de los orgánulos presentes autofágicos (Kanzawa et al. 2004). El ensayo se realizó del siguiente modo: las células se cultivaron en placa de 6 pocillos (2×10^5 / Pocillo) 24 h en la presencia del fármaco, se desprendieron con tripsina y se tiñeron con 1 µg/ml de AO en RPMI sin rojo de fenol durante 15 min a TA. Después finalizado el periodo de incubación, las células se lavaron y se resuspendieron en PBS. La emisión de fluorescencia verde y roja se midió con FACSCalibur y se analizó usando el software CellQuest.

Medición de la liberación de NO y acumulación de nitrito

45 La acumulación de nitrito como medida indirecta de la liberación de NO se midió mediante la reacción de Griess como se ha descrito anteriormente (Mijatovic et al. 2004). diacetato DAF-FM (Molecular Probes) en RPMI 1640 sin rojo fenol. Las células se lavaron después y se incubaron durante 15 min adicionales a 37 °C en medio RPMI 1640 fresco antes del tratamiento con fármacos. Después de 2 h, las células se digirieron con tripsina, se lavaron y, por último, se resuspendieron en PBS y se analizaron mediante FACSCalibur usando el software Cell Quest.

50 *ELISA basado en células*

Un procedimiento ligeramente modificado para el ELISA basado en células (ELISAc) de Versteeg (Versteed et al., 2000) se utilizó para medir la expresión de galactocerebrósido, proteína ácida glial fibrilar (GFAP), proteína básica de la mielina (MBP), ciclina D3, p53 y p-AKT. Brevemente, al final del periodo de cultivo las células se fijaron en paraformaldehído al 4%, peroxidasa endógena, se inactivó con 1% de H₂O₂ en PBS que contenía 0,1% de Triton X-100 (PBST), y la unión inespecífica de anticuerpos se bloqueó con solución PBST que contenía 10% de FCS. Anticuerpos monoclonales primarios de ratón específicos de la p-At de ratón/rata (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), GFAP (1:200, BioYeda, Israel.), galactocerebrósido (1:100; Boehringer Mannheim, Mannheim,

Alemania), MBP (1:100, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), ciclina D3 (1:750, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y p53 (1:250, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) se aplicaron en PBST suplementado con 2 % de seroalbúmina bovina (PBSTB), seguido de IgG secundaria de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa (1:2500 in PBSTB; GE Healthcare, Reino Unido) para IgG anti-GFAP y galactocerebrósido anti-conejo (1:2500, Healthcare Reino Unido) para anti-p-Akt, anti-ciclina D3 y anti-p53. Todas las incubaciones se realizaron a 37 ° C durante 1 h. La absorbancia a 450 nm se midió en un lector de microplacas automatizado 15 min después de la incubación con sustrato de peroxidasa TMB y posteriormente a la adición de HCl 0,1 M. Para facilitar la comparación entre tratamientos, las absorbancias obtenidas se corrigieron para el número de células que se determinó por tinción con cristal violeta, como se describe en el protocolo original. Los resultados se presentan como expresión relativa en comparación con el valor de control.

Ensayo de actividad de la tirosinasa y determinación de melanina

La actividad tirosinasa se determinó midiendo la tasa de oxidación de la L-DOPA³⁴. Brevemente, los cultivos subconfluentes en placa de 6 pocillos se lisaron en 100 µl de tampón fosfato a pH 6,8- 1% de Triton X-100 y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min. 40 µl de cada extracto se mezclaron con 100 µl de la solución sustrato de L-DOPA (2 mg / ml). La reacción enzimática se llevó a cabo a 37 ° C y la absorbancia a 570 nm se leyó cada 10 min durante al menos 1 h. La actividad final se corrigió mediante la cantidad total de proteína estimada por el ensayo de Bradford. Para la determinación de la melanina, las células se incubaron en placa de 6 durante 24 h, se digirieron con tripsina, se contaron y se lisaron en 100 µl de NaOH 1M. Se añadieron 400 µl de agua destilada y las muestras se incubaron a 60 ° C durante 1 h. Después, se midió la absorbancia del colorante disuelto a 492 nm.

Detección inmunocitoquímica

La detección de la expresión de ciclina D3 y la expresión de p53 se realizó mediante el procedimiento de inmunocitoquímica como se ha descrito previamente (Mijatovic et al, 2005). Las células fueron cultivadas en portaobjetos-cámara de cristal (3 x 10⁴ células / pocillo) y la expresión de ciclina D3 y de p53 se detectó con anticuerpos específicos contra la ciclina D3 (1: 1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y p53 (1: 500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). El reconocimiento de los anticuerpos primarios se realizó con el kit de tinción de peroxidasa-estreptavidina de conejo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma) utilizando diaminobencidina (R & D Systems, Minneapolis, MN) como sustrato. Las células se contratificaron con hematxilina de Mayer y los portaobjetos se montaron con medio de montaje Glycergel (Dako, Glostrup, Dinamarca).

Análisis de transferencia de tipo Western

Las células (1x10⁶) se sembraron en matraces (25 cm³), se incubaron en 0,5% de FCS RPMI durante la noche y posteriormente se trataron con fármacos durante 30, 60 y 120 min. Los lisados de células enteras se prepararon en una solución que contiene Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8 a 25 ° C), 2% p / v de SDS, 10% de glicerol, DTT 50 mM, 0,01% p / v azul de bromofenol y se sometieron a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Las muestras se electrotransferieron a membranas de difluoruro de polivinilideno a 5 mA / cm², utilizando el sistema de transferencia semiseca (Fastblot B43, Biorad, Goettingen, Alemania). Las transferencias se bloquearon con 5% en peso / v de leche desecada desgrasada en PBS 0,1% de Tween-20 y se sondaron con anticuerpos específicos para p53, CD3, Akt, Akt fosforilada y actina (todas diluidas a 1:1000; Akt, p-Akt eran de Cell Signalling Technology, Boston, MA; CD3, p53 y actina eran de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), seguido de la incubación con un anticuerpo secundario (ECL de burro anti-conejo marcado con HRP, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). La detección se realizó mediante quimioluminiscencia (ECL, GE Healthcare)

Inducción del melanoma en ratones C57BL/6 ratones y tratamiento con fármacos

Con el fin de inducir el tumor primario a 2 x 10⁵ células de melanoma B16 se inyectaron por vía subcutánea (s.c.) en la región lumbosacra dorsal derecha de ratones C57BL / 6 singénicos. Se observó el crecimiento del tumor a diario, y el tratamiento farmacológico se inició desde el primer día "10 después de la implantación. Soluciones frescas de Saq y Saq-NO se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 10 mg / kg de peso corporal durante 15 días consecutivos. Se sacrificó a los ratones el día 30, el crecimiento tumoral se determinó mediante mediciones tridimensionales de tumores individuales de cada ratón. El volumen del tumor se calculó como: [0,52 x a x b²], en la que a es el diámetro más largo y b es el diámetro más corto como se describió previamente (Maksimovic-Ivanic et al. 2008).

Toxicidad Aguda

definir la toxicidad aguda de Saq y Saq NO, el compuesto de ensayo se administró i.p. a ratones CD1 a las dosis únicas de 250, 500, 1000 y 1500 mg / kg. Los grupos de control se trataron i.p. con vehículo (DMSO puro; 100 µl// ratón). Cada grupo estaba formado por 10 ratones. La mortalidad se evaluó cada hora durante las primeras 4 horas y después cada 10 horas hasta 14 días después de la dosificación.

Análisis estadístico

La significación de las diferencias entre diversos tratamientos se analizó mediante ANOVA seguido de la prueba de

Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples. Un valor p inferior a 0,05 se consideró significativo-

Resultados

Saq-NO disminuyó fuertemente la viabilidad del tumor pero no las células primarias

El efecto de la SAC y de Saq-NO se evaluó sobre la viabilidad de las distintas líneas celulares humanas transformadas (adenocarcinoma cuello uterino HeLa, BT20 y HCC 1419 de carcinoma de mama, PC-3 de carcinoma de próstata) y roedores (C6 astrocitoma de rata y B16 de melanoma de ratón), como se así como las células no transformadas primarias (astrocitos primarios de rata y fibroblastos de ratón). Como evaluado mediante el ensayo de cristal violeta (Fig.2A, 2B) y la respiración mitocondrial (no mostrado), ambos compuestos presentan un fuerte potencial antitumoral. El compuesto modificado por NO fue más eficiente, con el valor IC₅₀ de dos a cuatro veces más bajo que el fármaco original. Curiosamente, el aumento adicional de las concentraciones Saq-NO no disminuyó más aún más la viabilidad.. Además, Saq-NO no afectó a la viabilidad de los astrocitos y fibroblastos primarios no transformados, mientras que dosis de IC50 de Saq era altamente tóxicas (Fig.2C). Por lo tanto, era evidente que la unión de NO en el compuesto parental fuertemente reforzada su potencial tumoricida y casi totalmente abrogada su toxicidad contra las células primarias. Para delinear los mecanismos citotóxicos de las dos preparaciones diferentes Saq utilizamos líneas celulares de roedores C6 y B16 como representante.

Saq-ND Liberación cantidad insignificante de NO. Mejora observada de la acción tumoricida Saq después de su modificación química podría ser la consecuencia de la cantidad y la cinética de liberación de NO. Con el fin de evaluar la magnitud de la liberación de NO por el fármaco, la acumulación intracelular de NO y su liberación en los sobrenadantes del cultivo celular después de 24 h de incubación de las células tumorales se midió en presencia de Saq-NO. Sorprendentemente, a diferencia de otros fármacos modificados con NO, el tratamiento con Saq-NO indujo liberación intracelular menor de NO tanto en las células B16 como en C6 (Fig. 3A). De forma concordante se observó una insignificante liberación de NO en los sobrenadantes de cultivos celulares (Fig. 3B). Estos datos sugieren que la menor cantidad de NO liberado del fármaco no puede ser directamente responsable de la toxicidad inducida por fármacos contra las células malignas y que dicha modificación estructural del fármaco parental daba un perfil farmacológico cualitativamente nuevo, muy distinto de otros compuestos donantes de NO.

La actividad antitumoral de Saq-NO se basó principalmente en la actividad citostática

En los siguientes experimentos, se comparó la capacidad de Saq y Saq-NO para inducir diferentes tipos de muerte celular. Primero se analizó la presencia de necrosis mediante el ensayo de liberación de LDH. La prueba se basa en la característica de las células necróticas para la liberación de LDH en el sobrenadante de células debido a daños en la membrana celular. Como se ve en la figura 4A, el tratamiento de las células C6 y B16 Saq indujo liberación de LDH en ambas líneas celulares de un modo dependiente de la dosis, lo que sugiere la importancia de la muerte celular necrótica como mecanismo primario o secundario de acción del fármaco. Sin embargo, se detectó un porcentaje significativo de citotoxicidad C6 solamente tras la dosis más alta de tratamiento con Saq-NO, lo que indica que la necrosis no es responsable de la actividad antiglioma observada del nuevo compuesto. Por otro lado, en células de melanoma se detectó liberación de LDH dependiente de la dosis tras todas las dosis analizadas del tratamiento con Saq-NO (Fig. 4A). Por otra parte, Saq-NO indujo citotoxicidad significativa incluso a la dosis más baja analizada, lo que indica una mayor sensibilidad de B16 a Saq-NO que a Saq. Además, no pudo detectarse una liberación significativa de LDH antes de 18 horas de exposición al fármaco (2,3% en los controles frente al 6,2% en cultivos tratados con Saq-NO 18,8 μ M), lo que indica que la necrosis es más bien la consecuencia que el principal mecanismo de acción del fármaco. Para investigación adicional, se seleccionó la dosis de 18,8 μ M de Saq-NO que reducía la viabilidad celular de aproximadamente 50% en C6 y 70% en B16 y se comparó con la misma dosis de Saq. En vista del hecho de que las células B16 y C6 se conocen como células propensas a autofagia, se evaluó la contribución de la autofagia en los efectos anti-tumorales de ambos fármacos. Ni Saq-NO ni Saq aumentaron la cantidad de vesículas ácidas en el citoplasma de las dos líneas celulares destacó la ausencia de autofagia como proceso de muerte o de rescate (Fig.4B).

A continuación, se evaluó la influencia de los fármacos sobre la distribución del ciclo celular. Las células tratadas con Saq no mostraron una distribución considerablemente diferente de la de las células control no tratadas (Fig.4C). En los cultivos de células C6 Saq-NO aumentó ligeramente el porcentaje de células en el compartimiento subG e indujeron una parada particularmente marcada en G₀/G₁ (Fig. 4C, , panel izquierdo). En paralelo, el mismo tratamiento de las células B16 produjo apoptosis estadísticamente significativa y la acumulación de células en fase G₂/ M del ciclo celular (Fig.4C, panel derecho). El bloqueo del ciclo celular dominante seguido con una pequeña presencia de la apoptosis, ausencia de autofagia y muerte celular necrótica en las células de glioma planteó la posibilidad de que la inhibición de la proliferación en vez de la inducción de la muerte celular es el mecanismo responsable de las propiedades antitumorales de Saq-NO. El predominio de la actividad citostática del fármaco se confirmó mediante tinción CFSE. Mientras que aproximadamente el 90% de las células de control se divide después de 48 h, tras el tratamiento con Saq-NO menos del 10% de las células pueden proliferar (Fig.4D, panel izquierdo). Las células B16, que sobrevivieron el tratamiento con Saq-NO, mostraron disminución del potencial de división, así como las células C6, lo que sugiere la prioridad de este mecanismo en la acción de los compuestos. Adicionalmente, mientras que la retirada Saq restauró principalmente la viabilidad de las células después de 24 horas, la eliminación de Saq-NO en las mismas condiciones tuvo como resultado una recuperación muy leve, lo que sugiere que la

pérdida de capacidad proliferativa era permanente (Fig.4D, panel derecho). En resumen, estos resultados indican fuertemente la capacidad citostática superior de Saq-NO.

Saq-NO indujo diferenciación de las células C6 y B16 neuroectodérmicas

La inhibición de la proliferación celular como resultado de tratamiento farmacológico se acompañó de una transformación morfológica de las dos líneas celulares tumorales analizadas (Fig.5A). Para explorar más a fondo si las características morfológicas se correlacionaron con cambios fenotípicos, los autores analizaron la expresión de marcadores de diferenciación en cultivos de células C6 y B16. En vista del hecho de que la expresión del marcador oligodendrocítico, galactocerebrósido, estaba fuertemente regulada por aumento, mientras que la expresión de GFAP estaba disminuida o sin modificar (Fig.5B, panel izquierdo), parece que las células C6 después del tratamiento con Saq, y particularmente con Saq-NO, adoptaron el fenotipo de los oligodendrocitos en lugar del de los astrocitos. Por otro lado, el aumento del contenido en melanina y la actividad de la tirosinasa de las células B16 sólo después del tratamiento con Saq (Fig.5B, panel derecho), y la transformación morfológica observada (Fig.5A, panel derecho) indicaron que las células adquieren el fenotipo melanocítico. Por el contrario, junto a la transformación morfológica evidente desencadenada por Saq-NO, las células B16 mostraron una leve pero significativa disminución en la actividad de la tirosinasa y la cantidad de melanina sin cambios. En paralelo, dichas células mostraron una elevación moderada de la expresión de MBP (Fig.5B, panel derecho), lo que indica que las células B16 adoptaban el fenotipo de las denominadas "células de tipo Schwann". Este proceso se describe en la literatura como "transdiferenciación" (Reed JA, 1999) y se presenta la etapa final antes de la involución de los melanocitos.

De acuerdo a la relevancia de la expresión de ciclina D3 y de la p3, proteína supresora tumoral, en el desarrollo de oligodendrocitos, su participación en el proceso de diferenciación desencadenado por los compuestos ensayados se investigó después en las células C6 y B16. Después de 24 h de incubación en la presencia de Saq y SaqNO, la expresión de ciclina D3 y de p53 se determinó mediante ELISAC (Fig.5C, paneles superiores) e inmunocitoquímica (Fig.5C, paneles inferiores), la transferencia de tipo Western confirmó el mismo fenómeno sólo 4h después de la exposición al fármaco (Fig.5C, paneles centrales). Mientras que el tratamiento de las células con Saq resultó en la actividad regulada al alza de ciclina D3 y p53, Saq-NO afectó a la expresión de p53 en mucho mayor grado que Saq, mientras que la expresión de ciclina D3 en ambas líneas celulares no se ha cambiado considerablemente (Fig.5C). Tomados en conjunto, la unión covalente de NO a Saq generó diferencias significativas de la actividad farmacológica a nivel intracelular.

Saq y Saq-NO regulan al contrario la vía de señalización de AKT. Está bien documentado que la vía de señalización de PI-3K-Akt es uno de los objetivos intracelulares más importantes de Saq y otros inhibidores de la proteasa de VIH, lo que podría ser relevante para sus propiedades tumorocidas pero también responsable de la alta toxicidad observada de esta familia de fármacos. Teniendo en cuenta los datos anteriores sobre las propiedades antitumorales conservadas del inhibidor de la proteasa del VIH modificado-Saq-NO y la ausencia de su toxicidad contra las células normales, el próximo investigó la posible influencia del fármaco sobre la vía de señalización mediada por Akt. Los resultados obtenidos indicaron claramente que Saq anulaba la expresión de p-Akt incluso en esta dosis bastante ineficaz, mientras que, totalmente opuesta a ella, Saq-NO indujo una considerable fosforilación transitoria de AKT. Ambos fármacos, modificados y el compuesto original, demostraron un modo de acción similar en las células B16 y C6, y los resultados obtenidos por ELISAC y transferencia de tipo Western se presentaron en las células B16 como representante (Fig.6A, 6B). Además, el tratamiento de las células con inhibidor específico de aguas arriba PI-3 quinasa, 3-MA, o un inhibidor de Akt, AKT VI, resultó en mayor disminución de la viabilidad celular del tumor (Fig.6B). Los resultados indicaron claramente que la actividad anti-tumoral conservada e incluso potenciada del compuesto modificado con NO no estaba mediada por la inhibición ni la regulación positiva de la actividad de Akt. Por otra parte, la potenciación de la actividad de Akt presenta una señal de protección y podría ser un candidato principal para la falta de la toxicidad en células primarias expuestas a este compuesto modificado con NO.

Saq y Saq-NO redujeron el crecimiento de melanoma B16 en ratones C57BL/6 singénicos. Con el fin de investigar y comparar las propiedades antitumorales in vivo del compuesto parental y recién generado, las células tumorales B16 se inocularon s.c. en ratones C57BL / 6 singénicos y después se trataron i.p. con Saq o Saq-NO. El tratamiento farmacológico se inició 10 días después de la inducción de tumores y se prolongó durante 15 días consecutivos. Como se ve en la figura 7, en la autopsia (día 30 posterior a la exposición tumoral) todos los animales control desarrollaron tumores sólidos. En el grupo tratado con Saq, 3/9, los animales desarrollaron tumores, pero con un volumen significativamente reducido. Finalmente, sólo se observó un tumor en el grupo tratado con Saq-NO. En paralelo, los animales que recibieron Saq mostraron una notable pérdida de peso corporal (10% del peso corporal inicial) y 4 animales sin tumores mostraron una fuerte inflamación del peritoneo. Por otra parte, no se observaron signos visibles de toxicidad tras el tratamiento con Saq-NO; además, los animales aumentaron su peso corporal (13% del peso corporal inicial).

Toxicidad in vivo de Saq y Saq NO

Aunque no se observó mortalidad a ninguna de las dosis analizadas de Saq-NO, Saq fue capaz de inducir el 100% de letalidad a la dosis de 1.500 mg / kg a 144 horas (media \pm SD = 65 \pm 58), 30% a la dosis de 1.000 mg / kg y 20% a la dosis de 500 mg / kg en un plazo de 24 horas después de la administración.

Discusión

Recientemente se ha mostrado que los IP-VIH, además de su capacidad para inhibir la principal proteasa del VIH, poseían fuertes características anti-tumorales. Los IP-VIH pueden inhibir el crecimiento de numerosos tipos de líneas de células tumorales, tales como el mieloma múltiple, liposarcoma SW872, carcinoma de vejiga T24, carcinoma de pulmón A549, U373 glioblastoma, células de leucemia Jurkat, células de cáncer de próstata DU-145 y PC-3, células de leucemia mielocítica humana NB4 y HL-60 y sarcoma de Kaposi (Chow et al. 2006, Pajonk et al. 2002, Ikezoe et al. 2004, Ikezoe et al. 2000, Gills et al. 2007). Además, dichos fármacos pudieron disminuir la incidencia y estimular la regresión del sarcoma de Kaposi, y ampliar la eficacia terapéutica de la radio y quimioterapia de los cánceres de la cabeza, el cuello, la vejiga y de la próstata (Pajonk et al. 2002, Ikezoe et al. 2004, Sgadari et al. 2002, Ikezoe et al. 2004, Gupta et al. 2005, Cuneo et al. 2007). Sin embargo, la administración de larga duración de este tipo de fármacos provoca efectos adversos impredecibles como hiperbilirrubinemia, hiperlipidemia o hipolipidemia, resistencia a la insulina y diabetes etc. (Sgadari et al., 2003).

El compuesto de la invención, SAQ-NO, dio lugar a la potenciación de las propiedades antitumorales y anulación de la toxicidad contra el tejido normal. Con más detalle, el diferente modo de acción del fármaco recién sintetizado se asocia con una potencia más alta en la supresión del crecimiento de varias líneas celulares tumorales de roedores y humanas. Por otra parte, la toxicidad hacia las células primarias se superó casi completamente. Si bien se considera que la liberación de NO a partir de otros compuestos donadores de NO es directa o indirectamente responsable de su citotoxicidad (Rigas et al. 2004), Saq-NO libera sólo la cantidad mínima de NO que no es lo suficientemente fuerte como para ser citotóxica, pero en realidad podría ser el modulador de numerosos eventos intracelulares. La limitación de la expansión de células tumorales inducida por Saq es principalmente una consecuencia de la inducción de la apoptosis (Ikezoe T et al 2004). Si bien este tipo de muerte celular programada es crucial para la viabilidad disminuida de las células C6 y B16 expuestas a dosis más altas de Saq, la contribución de la muerte de células tumorales (accidental o programada) en cultivo con el compuesto modificado es menor. En concordancia con la disminución evidente de la viabilidad de las células tumorales, se observó parada del ciclo celular y tinción de CFSE confirmó que la inhibición de la proliferación es crucial para la actividad anticancerígena de Saq-NO. De acuerdo con esto, las células todavía eran incapaces de dividir incluso después de la retirada del fármaco, lo que sugiere que pérdida de propiedades proliferativas era permanente. En paralelo, el fármaco estimuló una alteración morfológica significativa de las células C6 y B16, lo que indica la transformación fenotípica de precursores malignos. La capacidad de las células C6 y B16 para diferenciarse está bien documentada. Dependiendo del estímulo, las células C6 poseen capacidad de diferenciación bidireccional. Por lo tanto, se demostró que tras la exposición a la antraquinona Aloe emodina, así como a la aglutinina de *Datura stramonium* y estaurosporina, potente inhibidor de PKC. Las células C6 se sometieron a diferenciación hacia un linaje astocítico, mientras que otros agentes, tales como saicosaponinas A y D aisladas de *Bupleurum Radix* estimularon la maduración en oligodendrocitos (Mijatovic et al. 2005 2005, Tsai et al. 2004, Sasaki et al. 2002, Kronfeld I et al. 1995). Las células B16, originadas a partir de los mismos precursores embrionarios que C6, desencadenaron la hormona estimuladora de α melanocitos, y radiación ultravioleta A y B, así como agentes farmacológicos tales forskolina, toxina del cólera, isobutilmetilxantina, ácido retinoico, y el lípido manoseritritol, obtuvieron las características de melanocitos primarios (Busca et al. 1996, Busca et al. 1998, Valverde et al. 1993, Bennet et al. 1994, Ohguchi et al. 2004, Gruber et al. 1992, Zhou et al. 1999). De acuerdo con esto, la determinación de la expresión de marcadores de la diferenciación relevantes tras el tratamiento con el compuesto parental o con el compuesto modificado con NO reveló que las células C6 entraban en el proceso de diferenciación en oligodendrocitos. Se ha descrito previamente que algunos inhibidores de la proteasa del VIH inducen preadipocitos y diferenciación de las células de leucemia mielocítica humana (Ikezoe et al 2000, Chow et al 2006, Nguyen et al. 2000). Por otro lado, mientras que Saq indujo la diferenciación de las células B16 hacia melanocitos, Saq-NO mostró los efectos opuestos sobre la síntesis de melanina y la actividad de la tirosinasa. Se encontró que algunas circunstancias dirigen las células B16 al proceso conocido como "transdiferenciación" con el resultado de Schwan como fenotipo (Slutsky et al. 2003). Se consideró que este perfil celular es en realidad el punto final en la ruta de involución de los melanocitos naturales (Reed JA et al. 1999). La regulación por disminución de los marcadores melanocíticos tras la exposición a Saq-NO se vigiló y se observó expresión elevada de MBP, lo que sugiere que este tratamiento empujaba a las células B16 directamente hacia la etapa final de la columna de vida de los melanocitos,

Tokomoto et al (Yasuhito M. Tokomoto, Be'atrice Durand, 1 y Martin C. Raff, 1999) han establecido con anterioridad la conexión entre la expresión de ciclina D3 y el desarrollo de oligodendrocitos estimulado por la retirada de PDGF ro por el tratamiento hormonal de la tiroides. Se observó regulación por aumento de ciclina D3, ciclina miembro de la familia D más ampliamente expresada en los mamíferos (Bartkova et al., 1998) en algunas líneas celulares de mioblastos (Jahn et al.,1994; Kiess et al.,1995; Rao y Kohtz, 1995) y en la línea de leucemia promielocítica humana HL 60 (Bartkova et al.,1998) en el proceso de diferenciación. Además, la maduración oligodendrocítica de células madre multipotenciales inducida por la hormona tiroidea (Johe et al.,1996 Ahlgren et al.,1997; Barres et al.,1994; Ibarolla et al.,1996) estaba estrechamente relacionado con la regulación por aumento de D3 así como un mayor nivel de expresión de p53. El primero se describe en la literatura como molécula principal que conduce a las células precursoras de linaje oligodendrocítico. La diferenciación de las células C6 y B16 activadas por la Saq, se correlacionó con la acumulación elevada de ciclina D3, que es probablemente la consecuencia de sus propiedades inhibitoras del proteosoma 26S (Pajonk, 2002). Por otro lado, el nivel de las ciclinas D3 no se vio afectado por Saq-NO. Las discrepancias en la regulación de p53 y ciclina D3 por los dos fármacos, pero con resultado similar de

maduración de las células tumorales abre la cuestión de la prioridad de la ciclina D3 en este proceso. Además, una mayor cantidad de proteína p53 después de la exposición a Saq-NO en ambas líneas celulares ensayadas en comparación con los cultivos tratados con el compuesto parental es compatible con los datos de papel fundamental de la proteína p53 en la diferenciación neuronal de células de tejido (Billon et al. 2004). 2004). De acuerdo con esto, la actividad regulada al alza de p53 podría ser responsable de la diferenciación Saq y especialmente Saq-NO promovido observada de células C6 y B16 y el consiguiente desarrollo de las células en división y no malignas con el fenotipo reconocible, oligodendrocitos y células de tipo Shwann.

Está bien documentado que la actividad de los IP-VIH interfiere en la vía de señalización de PI-3K-Akt. Por ejemplo, nelfinavir, amprenavir y saquinavir pudieron inhibir la actividad de Akt en numerosas líneas celulares, pero mecanismo por el cual los fármacos mencionados obstruyen esta vía todavía no está claro (Gupta et al 2005). De acuerdo con los datos anteriores, Saq reguló por disminución la fosforilación de Akt en las células C6 y B16, lo que se tradujo en una disminución de la actividad de esta quinasa. La tasa de inhibición de Akt se correlacionó con la regulación por disminución de la viabilidad de las células tumorales, lo que indica la importancia de esta vía de señalización de la actividad tumoricida del fármaco. Además, la menor actividad de Akt se pudo relacionar con la capacidad de Saq para estimular la diferenciación de células de melanoma en melanocitos. Se ha demostrado que el agente elevador de AMPc forskolina induce la diferenciación de las células B16 mediante la inhibición de esta vía (Busca et al 1996). En contraposición, el tratamiento de la B16 con Saq-NO indujo la activación transitoria de Akt. Se observó una activación de Akt similar durante la diferenciación de las células endoteliales, osteoblastos y mioblastos (Marchetti et al., 2006, Raucci A et al. 2008, Horowitz JC et al. 2007). Curiosamente, la neutralización de Akt por el inhibidor de Akt específico o inhibidor de PI-3K aguas arriba tuvo como resultado una mayor disminución de la viabilidad celular. Los datos sugirieron que las propiedades antitumorales conservadas del compuesto modificado con NO no fue una consecuencia de su capacidad para modular la fosforilación de Akt. Esto es bastante contrario a la actitud de que esta señal presenta uno de los principales objetivos a través del cual Saq produjo su actividad tumoricida. Además, Saq-NO, a través de una potente estimulación temporal de Akt produjo una señal protectora de las células, lo que podría ser la causa de la falta de toxicidad del fármaco contra las células primarias. La característica del compuesto original, Saq, de regulación por disminución de la vía de PI-3K- Akt afectó espectacularmente a la propagación de la señal desencadenada mediante la unión al receptor de insulina, lo que altera este proceso y provoca la resistencia a la insulina (Gupta et al, 1995) .Este es el evento básico que podría ser responsable de uno de los efectos secundarios más graves del compuesto. La falta de esta señal de destrucción con la característica antitumoral conservada supone una gran ventaja del fármaco recién sintetizado en comparación con el compuesto parental. Además, el fuerte potencial antimelanoma in vivo de Saq-NO con ausencia total de toxicidad confirmó in vivo que proporciona un poderoso motivo para la evaluación de Saq-NO como un prometedor fármaco anticanceroso.

Además, Saq-NO muestra una actividad anti-VIH in vitro sobre el % CCR y las cepas CSCR4 que es al menos tan elevada como la de Saquinavir.

La adición de un resto NO a otro inhibidor de la proteasa de estructura similar a Saquinavir (es decir, ritonavir y nelfinavir) confiere propiedades favorables, similar a lo descrito anteriormente para Saq-NO.

Levendas de las figuras.

Figura 1. Síntesis de Saq-NO.

Figura 2. Toxicidad celular de Saq-NO frente a Saq. Saq-NO regula por disminución la viabilidad del tumor pero no de las células primarias. Líneas celulares humanas (A) y (B) de roedores (1×10^4 células / pocillo) y células primarias de roedor primarias / no transformadas (3×10^4 células / pocillo) (C) se expusieron a diferentes concentraciones de Saq o Saq-NO durante 24 h. A continuación se evaluó la viabilidad celular mediante la prueba de CV. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar de representantes de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, se refiere a los cultivos no tratados.

Figure 3. El tratamiento de las células tumorales con Saq-NO se siguió y se observó una liberación insignificante de NO. (A) se detectó NO intracelular mediante citometría de flujo de células teñidas con DAF-FM diacetato tras 24 horas de incubación de las células sin (control) o con Saq-NO ($18,8 \mu\text{M}$). Las células tratadas con GIT-27NO ($75 \mu\text{M}$) se utilizaron como control. (B) la acumulación de nitritos en los sobrenadantes de los cultivos celulares se detectó tras 24 horas de incubación de las células con las concentraciones indicadas de Saq-NO. Los datos se presentan como las medias \pm SD de representantes de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, hace referencia a cultivos sin tratar.

Figura 4. Saq-NO inhibió fuertemente la proliferación de células con menor contribución de muerte celular. (A) Las células tumorales se incubaron con diferentes dosis de Saq o Saq-NO durante 24 h, y se analizó de liberación de LDH. Los resultados se calculan como se indica en los materiales y procedimientos y se presentan como las medias \pm desviación estándar de representantes de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$). Las células tumorales se incubaron con $18,8 \mu\text{M}$ de Saq o Saq-NO. Después de 24 h de cultivo sin o con fármacos, las células se tiñeron con naranja AO (B) o PI (C) y se analizaron mediante citometría de flujo. Los datos se presentan como las medias \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, se refiere a los cultivos no

tratados. (D) Las células se tiñeron con CFSE, se incubaron durante 48 h con 18,8 μM de Saq o Saq-NO y la tasa de proliferación se determinó mediante citometría de flujo (paneles de la izquierda). Las células se incubaron con 18,8 μM de Saq o Saq-NO durante 24 h. A continuación, se retiraron o no los medicamentos de las células y se incubaron durante 24 horas más. La viabilidad celular se determinó mediante la prueba de CV después de 24 y 48 h de incubación (paneles de la derecha). Los datos se presentan como las medias \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, se refiere a los cultivos no tratados.

Figura 5. Saq y Saq-NO inducen la diferenciación de las células C6 y B16. Las células C6 y B16 se incubaron durante 24 h con 18,8 μM de Saq o Saq-NO. La morfología celular se evaluó mediante microscopía óptica (A). Los marcadores de la diferenciación celular de las células B16 y C6, galactocerebrósido, GFAP y MBP, se determinaron mediante un ELISA competitivo y de la actividad de la tirosinasa y melanina y se determinaron como se describe en materiales y procedimientos (B). La expresión de ciclina D3 y de p53 se evaluó mediante ELISAc (C, paneles superiores), inmunocitoquímica (C, panel central) y transferencia de tipo Western (C, panel inferior). Los resultados se presentan como las medias \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, se refiere a los cultivos no tratados.

Figura 6. Saq y Saq-NO regulan al contrario la actividad de Akt. Las células B16 (A) se incubaron con 18,8 μM de Saq o Saq-NO y la actividad de Akt se evaluó mediante ELISAc y los datos se presentan como las veces de aumento respecto a los valores obtenidos en los cultivos de control no tratados (* $p < 0,05$). Los efectos de Saq-NO se confirmaron mediante transferencia de tipo Western (B) en los puntos de tiempo indicados. (C) Las células B16 (1×10^4 células / pocillo) se incubaron durante 24 h con 18,8 μM de Saq-NO con o sin Akt VI (50 μg / ml) o 3-MA (1 mM) y la viabilidad celular se evaluó mediante MTT. Los datos se presentan como las medias \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, se refiere a los cultivos no tratados.

Figura 7. Saq y Saq-NO inhibieron el crecimiento del melanoma en ratones C57BL / 6. Los tumores se indujeron por implantación subcutánea de $2,5 \times 10^5$ células de melanoma B16 y Saq o Saq-NO se inyectaron i.p, durante 15 días consecutivos a partir del día 10 después de la implantación del tumor. Los volúmenes tumorales se determinaron 30 días después de la implantación del tumor, como se indica en Materiales y procedimientos.

Referencias

Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, Miljkovic Dj, Harhaji Lj, Vuckovic O, Stosic-Grujicic S, Mostarica Stojkovic M, Trajkovic V. (2005) Anti-glioma action of aloe emodin: the role of ERK inhibition. *Cell Mol Life Sci* 62: 589 - 98.

Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, Popadic D, Momcilovic M, Harhaji Lj, Miljkovic D, Trajkovic. V. Aloe-emodin prevents cytokine-induced tumor cell death: the inhibition of auto-toxic nitric oxide release as a potential mechanism. (2004) *Cell Mol Life Sci* 61:1805 - 15.

Kang W, Nielsen O, Fenger C, Leslie G, Holmskov U, Reid KB. Induction of DMBT1 expression by reduced ERK activity during a gastric mucosa differentiation-like process and its association with human gastric cancer. (2005) *Carcinogenesis* 26:1129 - 37.

Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. (1998) *J Immunol Methods* 115: 61 - 9.

Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. (2004) *Cell Death Differ* 11:448 - 57.

Versteeg HH, Nijhuis E, van den Brink GR, Evertzen M, Pynaert GN, et al. A new phosphospecific cell-based ELISA for p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, protein kinase B and cAMP-response-element-binding protein. (2000) *Biochem J* 350: 717 - 22.

Gupta AK, Cerniglia GJ, Mick R, McKenna WG, Muschel RJ. HIV protease inhibitors block Akt signalling and radiosensitize tumor cells both in vitro and in vivo. (2005) *Cancer Res* 65:8256 - 65.

Ikezo T, Hisatake Y, Takeuchi T, Ohtsuki Y, Yang Y, Said JW, Taguchi H, Koeffler HP. HIV-1 protease inhibitor, ritonavir: a potent inhibitor of CYP3A4, enhanced the anticancer effects of docetaxel in androgen-independent prostate cancer cells in vitro and in vivo. (2004) *Cancer Res* 64:7426 - 31.

Ikezo T, Saito T, Bandobashi K, Yang Y, Koeffler HP, Taguchi H. HIV-1 protease inhibitor induces growth arrest and apoptosis of human multiple myeloma cells via inactivation of signal transducer and activator of transcription 3 and extracellular signal-regulated kinase 1/2. (2004) *Mol Cancer Ther* 3:473 - 9.

Sgadari C, Monini P, Barillari G, Ensoli B. Use of HIV protease inhibitors to block Kaposi's sarcoma and tumour growth. (2003) *Lancet Oncol* 4:537 - 47.

- Gills JJ, Lopiccio J, Tsurutani J, Shoemaker RH, Best CJ, Abu-Asab MS, Borojerdi J, Warfel NA, Gardner ER, Danish M, Hollander MC, Kawabata S, Tsokos M, Figg WD, Steeg PS, Dennis PA. Nelfinavir, A lead HIV protease inhibitor, is a broad-spectrum, anticancer agent that induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in vitro and in vivo. (2007) *Clin Cancer Res* 13:5183 - 94.
- 5 Chow WA, Guo S, Valdes-Albini F. Nelfinavir induces liposarcoma apoptosis and cell cycle arrest by upregulating sterol regulatory element binding protein-1. (2006) *Anticancer Drugs* 17:891 - 903.
- Cuneo KC, Tu T, Geng L, Fu A, Hallahan DE, Willey CD. HIV protease inhibitors enhance the efficacy of irradiation. (2007) *Cancer Res* 67:4886 - 93.
- 10 Pajonk F, Himmelsbach J, Riess K, Sommer A, McBride WH. The human immunodeficiency virus (HIV)-1 protease inhibitor saquinavir inhibits proteasome function and causes apoptosis and radiosensitization in non-HIV-associated human cancer cells. (2002) *Cancer Res* 62:5230 - 5.
- Sgadari C, Barillari G, Toschi E, Carlei D, Bacigalupo I, Baccarini S, Palladino C, Leone P, Bugarini R, Malavasi L, Cafaro A, Falchi M, Valdembri D, Rezza G, Bussolino F, Monini P, Ensoli B. HIV protease inhibitors are potent anti-angiogenic molecules and promote regression of Kaposi sarcoma. (2002) *Nat Med* 3:225 - 32.
- 15 Ikezoe T, Daar ES, Hisatake J, Taguchi H, Koeffler HP. HIV-1 protease inhibitors decrease proliferation and induce differentiation of human myelocytic leukemia cells. (2000) *Blood* 96:3553 - 9.
- Tsai YJ, Chen IL, Horng LY, Wu RT. Induction of differentiation in rat C6 glioma cells with saikosaponins. *Phytother Res* (2002) 16: 117 - 21.
- 20 Busca R, Bertolotto C, Ortonne JP, Ballotti R. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70(S6)-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. (1996) *J Biol Chem* 271:31824 - 30.
- Busca R, Bertolotto C, Abbe P, Englaro W, Ishizaki T, Narumiya S, Boquet P, Ortonne JP, Ballotti R. Inhibition of Rho is required for cAMP-induced melanoma cell differentiation. (1998) *Mol Biol Cell* 9:1367 - 78.
- 25 Valverde P, Garcia-Borron JC, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA. Tyrosinase isoenzymes in mammalian melanocytes. 2. Differential activation by alpha-melanocyte-stimulating hormone. (1993) *Eur J Biochem* 217:541 - 8.
- Bennett DC, Holmes A, Devlin L, Hart IR. Experimental metastasis and differentiation of murine melanoma cells: actions and interactions of factors affecting different intracellular signalling pathways. (1994) *Clin Exp Metastasis* 12:385 - 97.
- 30 Ohguchi K, Banno Y, Akao Y, Nozawa Y. Involvement of phospholipase D1 in melanogenesis of mouse B16 melanoma cells. (2004) *J Biol Chem* 279:3408 - 12.
- Gruber JR, Ohno S, Niles RM. Increased expression of protein kinase C alpha plays a key role in retinoic acid-induced melanoma differentiation. (1992) *J Biol Chem* 267:13356 - 60.
- 35 Zhao X, Wakamatsu Y, Shibahara M, Nomura N, Geltinger C, Nakahara T, Murata T, Yokoyama KK. Mannosylerythritol lipid is a potent inducer of apoptosis and differentiation of mouse melanoma cells in culture. (1999) *Cancer Res* 59:482 - 6.
- Deeks SG, Smith M, Holodniy M, Kahn JO. HIV-1 protease inhibitors. A review for clinicians. (1997) *JAMA* 277: 145 - 53.
- 40 Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Harhaji L, Miljkovic D, Dabideen D, Fan Cheng K, Mangano K, Malaponte G, Al-Abed Y, Libra M, Garotta G, Nicoletti F, Stosic-Grujicic S. Anticancer properties of the novel nitric oxide-donating compound (S,R)-3-phenyl-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid-nitric oxide in vitro and in vivo. (2008) *Mol Cancer Ther* 7:510 - 20.
- Nguyen AT, Gagonon AM, Angel JB, Sorisky A. Ritonavir increases the level of active ADD-1/SREBP-1 protein during adipogenesis. (2000) *AIDS* 14:2467 - 73.
- 45 Gruber A, Wheat JC, Kuhen KL, Looney DJ, Wong-Staal F. Differential effects of HIV-1 protease inhibitors on dendritic cell immunophenotype and function. (2001) *J Biol Chem* 276: 47840 - 3.
- Andre P, Groettrup M, Klenerman P, de Guili R, Booth BL, Cerundolo V, Bonneville M, Jotereau F, Zinkernagel RM, Lotteau V. An inhibitor of HIV-1 protease modulates protease activity, antigen presentation and T cell responses. (1998) *Proc Natl Acad Sci* 95:13120 - 4.
- 50 Delmonte OM, Bertolotto G, Ricotti E, Tovo PA. Immunomodulatory effect of two HIV protease inhibitors, saquinavir and ritonavir, on lymphocytes from healthy seronegative individuals. (2007) *Immunol Letters* 111: 111 -

5.

Flexner C. HIV-protease inhibitors. (2006) Drug therapy 338: 1281 - 92.

Rauci A, Bellosta P, Grassi R, Basilico C, Mansukhani A Osteoblast proliferation or differentiation is regulated by relative strengths of opposing signalling pathways 2008. J Cell Physiol. 215(2):442 - 51.

5 Horowitz JC, Rogers DS, Sharma V, Vittal R, White ES, Cui Z, Thannickal VJ.

Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor-beta1 confers an anoikis-resistant phenotype to myofibroblasts. Cell Signal. 2007 Apr;19(4):761 - 71. Epub 2006 Nov 17.

Slutsky SG, Kamaraju AK, Levy AM, Clebath J, Revel M Activation of myelin genes during transdifferentiation from melanoma to glial cell phenotype (2003). J of Biol Chem 278:8960 - 8.

10 Billon N, Terrinoni A, Jolicoeur C, McCarthy A, Richardson WD, Melino G, Raff M. Roles of p53 and p73 during oligodendrocytes development (2003) Development 131:1211 - 20.

Marchetti V, Menghini R, Rizza S, Vivanti T, Lauro D, Fukamizu A, Lauro R, Federici M Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation vs Akt/Fox signalling (2006) Diabetes 55:2231 - 7.

15 Kronfeld I, Zsukerman A, Kazimirsky G, Brodie C. Staurosporine induces astrocytic phenotypes and differential expression of specific PKC isoforms in C6 glial cells (1995) J.

J Neurosci. 1995 Sep;15(9):6200 - 12.

Sasaki T, Yamazaki K, Yamori T, Endo T. Inhibition of proliferation and induction of differentiation of glioma cells with Datura stramonium agglutinin (2002) Br J Cancer. 87(8):918 - 23.

20 Rigas B, Kashfi K. Nitric-oxide-donating NSAIDs as agents for cancer prevention.(2004) Trends Mol Med 10:324 - 30.

Reed JA, Finnerty B, Albino AP Divergent cellular differentiation pathways during the invasive stage of cutaneous malignant melanoma progression (1999) Am J Pathol 155(2):549 - 55.

25 Yasuhito M. Tokumoto, Be' atrice Durand, 1 and Martin C. Raff (1999) An Analysis of the early events when oligodendrocyte precursor cells are triggered to differentiate by Thyroid Hormone, Retinoic Acid, or PDGF Withdrawal Developmental Biology 213, 327 - 339.

Bartkova, J., Lukas, J., Strauss, M., and Bartek, J. (1998). Cyclin D3: Requirement for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation. Oncogene 17, 1027 - 1037.

30 Jahn, L., Sadoshima, J.-I., and Izumo, S. (1994). Cyclins and cyclin dependent kinases are differentially regulated during terminal differentiation of C2C12 mouse cells. Exp. Cell Res. 212, 297 - 307.

Kiess, M., Gill, R. M., and Hamel, P. A. (1995). Expression of the positive regulator of cell cycle progression, cyclin D3, is induced during differentiation of myoblasts into quiescent myotubes. Oncogene 10, 159 - 166.

Rao, S. S., and Kohtz D. S. (1995). Positive and negative regulation of D-type cyclin expression in skeletal myoblasts by basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. J. Biol. Chem. 270, 4093 - 4100.

35 Rao, S. S., and Kohtz D. S. (1995). Positive and negative regulation of D-type cyclin expression in skeletal myoblasts by basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. J. Biol.

Johe, K. K., Hazel, T. G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M. M., and McKay, R. D. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from fetal and adult central nervous system. Genes Dev. 10, 3129 - 3140.

40 Ahlgren, S. C., Wallace, H., Bishop, J., Neophytou, C., and Raff, M. C. (1997). Effect of thyroid hormone on embryonic oligodendrocyte precursor cell development in vivo and in vitro. Mol. Cell. Neurosci. 9, 420 - 432.

Barres, B. A., Lazar, M. A., and Raff, M. C. (1994). A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. Development 120, 1097 - 1108.

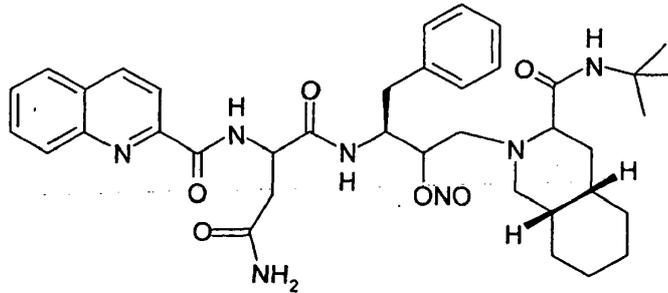
Ibarrola, N., Mayer-Pro" uschel, M., Rodriguez-Pena, A., and Noble, M. (1996). Evidence for the existence of at least two timing mechanisms that contribute to oligodendrocyte generation in vitro. Dev. Biol. 180, 1 - 21.

45

REIVINDICACIONES

1. Ésteres nítricos de los inhibidores de la proteasa del VIH en los que los inhibidores de la proteasa del VIH son seleccionados de saquinavir, ritonavir, nelfinavir.
2. Éster nítrico de Saquinavir acuerdo con la reivindicación 1, de fórmula I

5



Saquinavir-NO

sus sales no tóxicas, solvatos, formas polimórficas y/o o cristalinas polimórfica.

3. Composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de las reivindicaciones 1-2, en mezcla con portadores / excipientes adecuados.
4. Los compuestos de las reivindicaciones 1-2, para su uso en el tratamiento de tumores o infecciones por el VIH.
5. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para su uso en el tratamiento de pacientes afectados por tumores y / o infecciones de VIH que comprende la administración a dichos pacientes de una cantidad eficaz de dichos compuestos

15

Figura 1

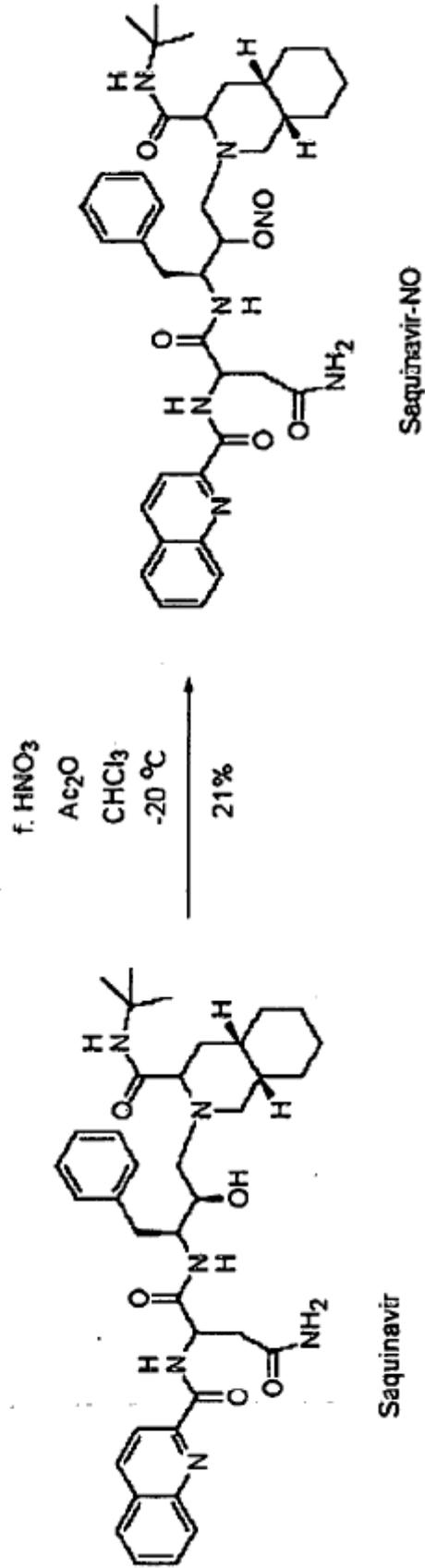
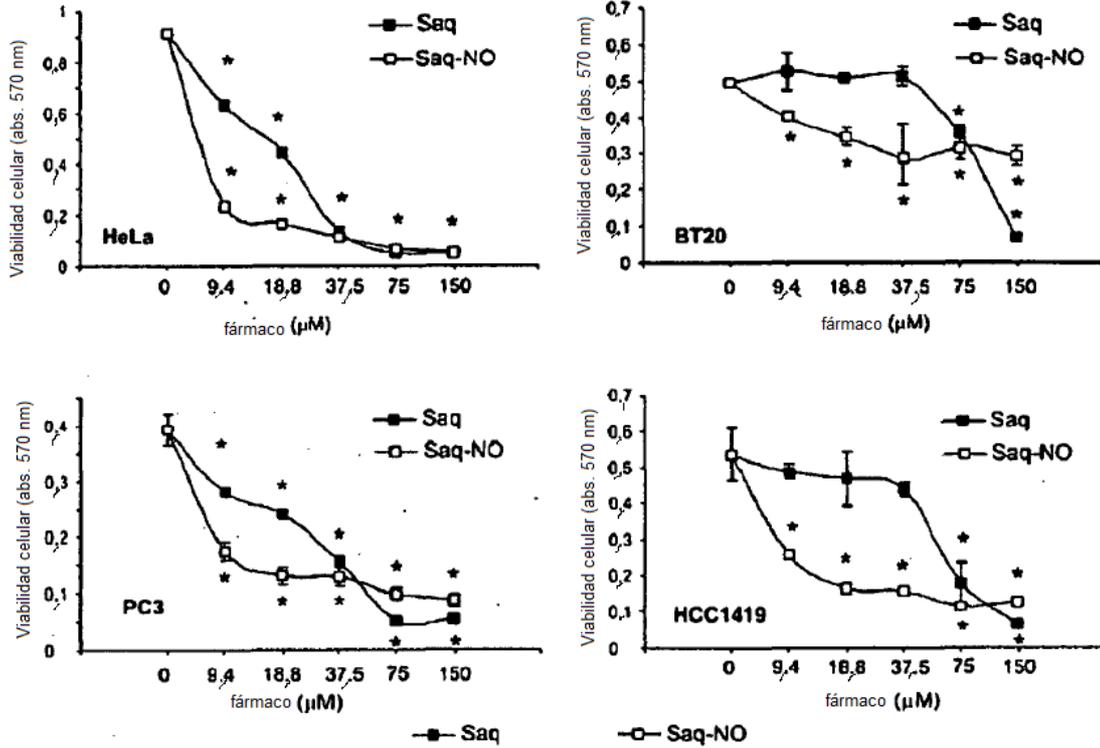
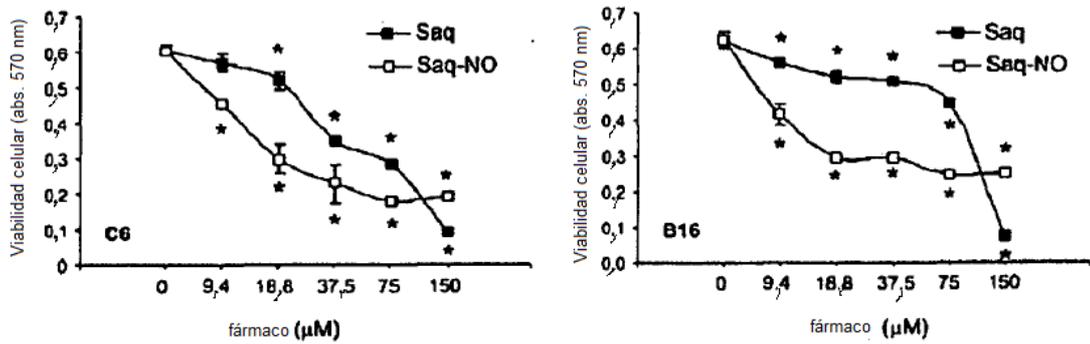


Figura 2

A



B



C

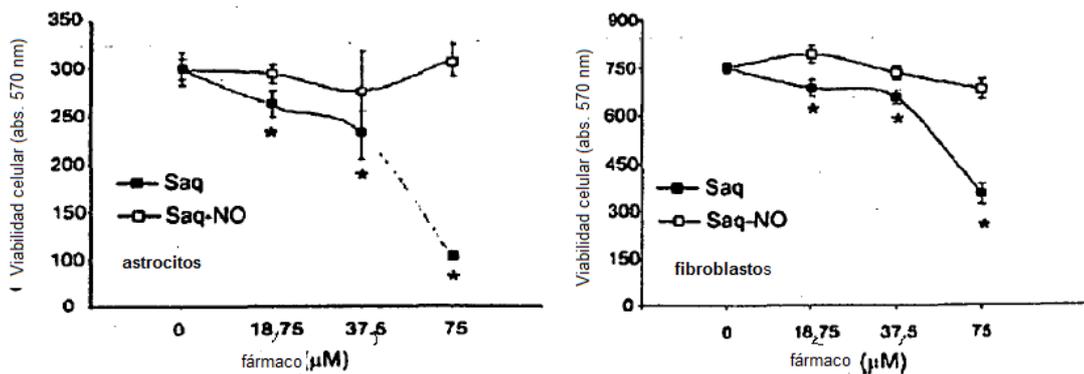


Figura 3

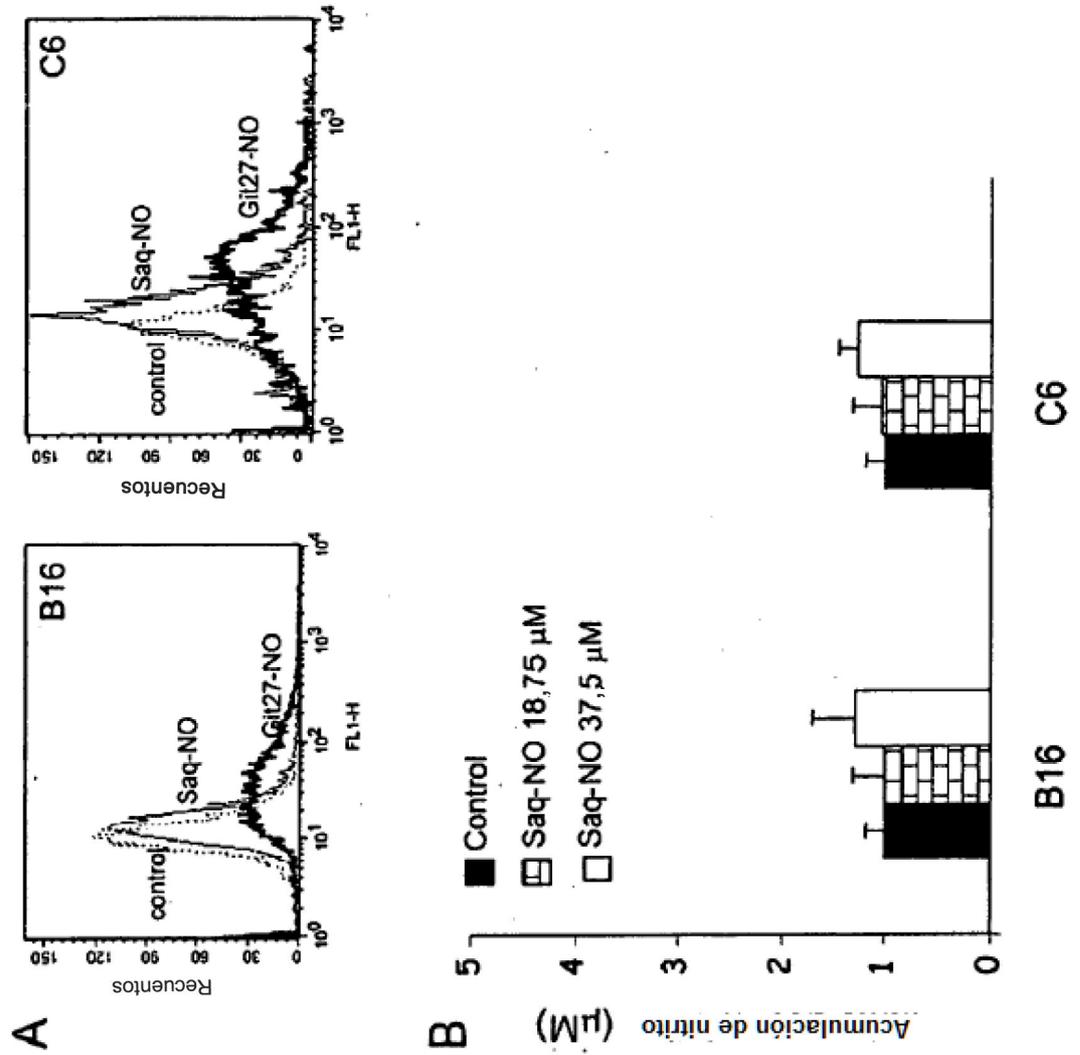


Figura 4

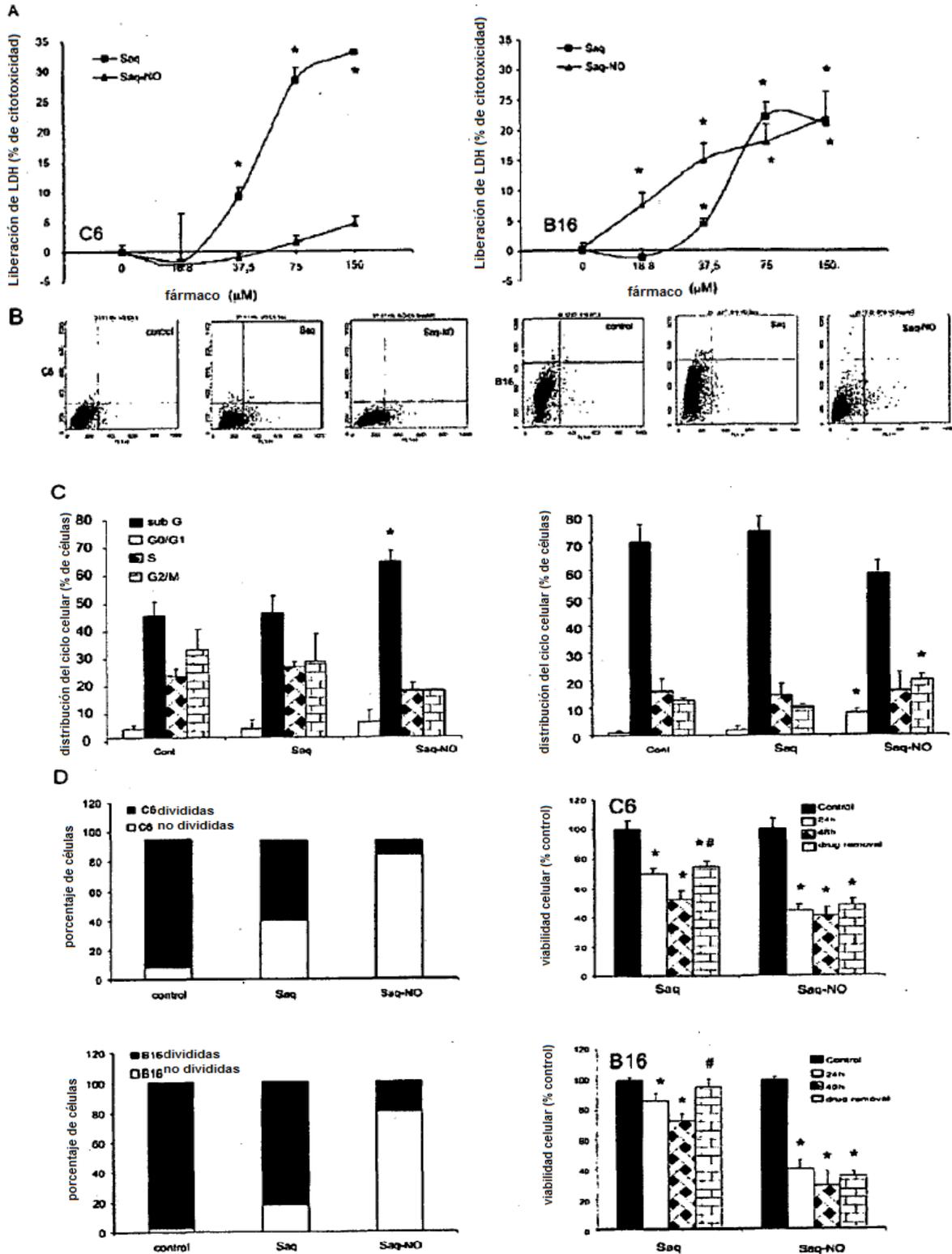


Figura 5

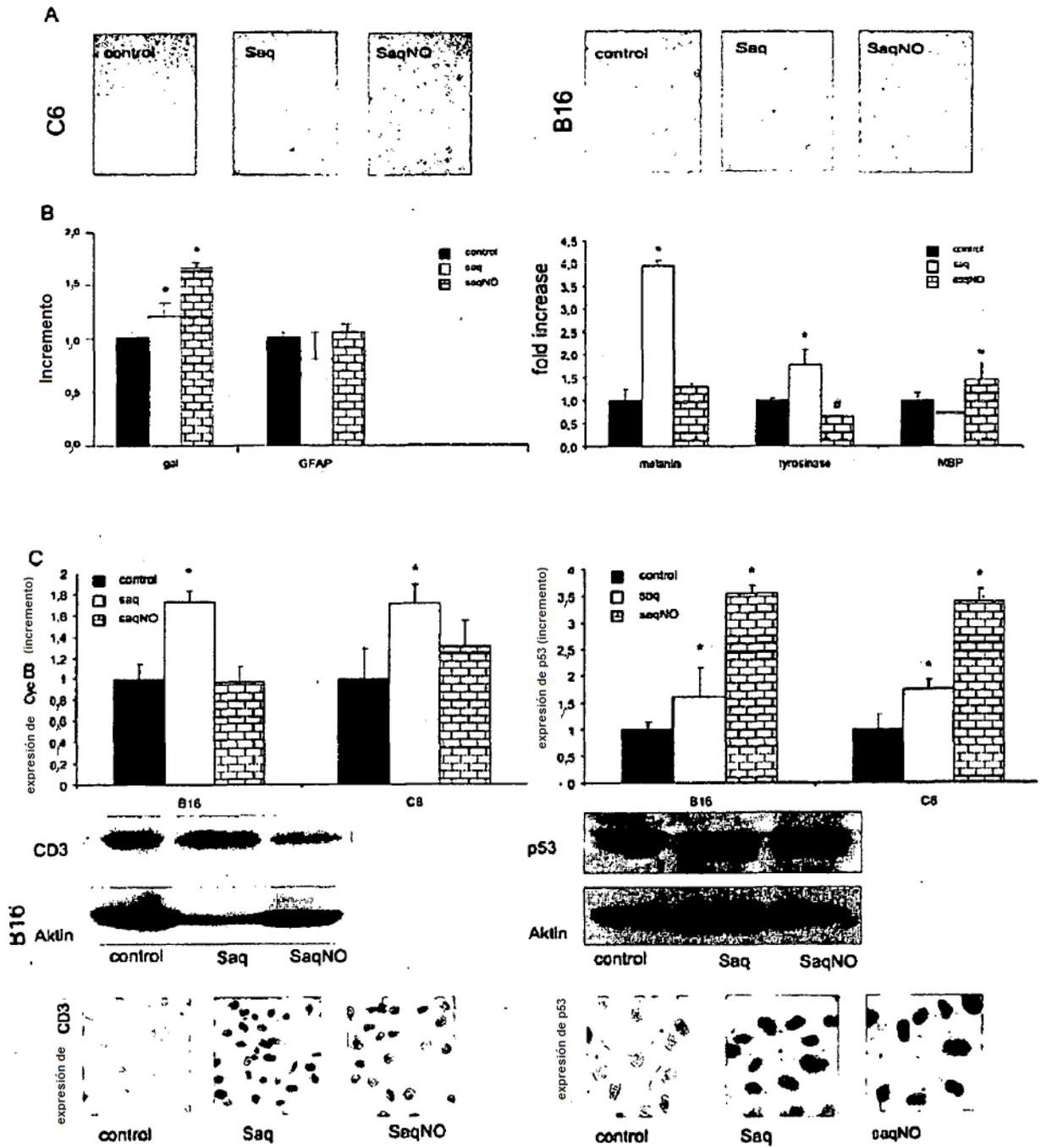


Figura 6

