

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 833**

51 Int. Cl.:

A61K 31/075 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/225 (2006.01)
A61K 31/401 (2006.01)
A61K 31/417 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2011 E 11745447 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2538935**

54 Título: **Supresión del crecimiento del cáncer y la metástasis mediante el uso de derivados de ácido nordihidroguayarético con 7-hidroxiestaurosporina**

30 Prioridad:

22.02.2010 US 306680 P

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

30.12.2014

73 Titular/es:

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)
3400 North Charles Street
Baltimore, MD 21218 , US

72 Inventor/es:

HUANG, RU CHIH C. y
KIMURA, KOTOHIKO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 525 833 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

Supresión del crecimiento del cáncer y la metástasis mediante el uso de derivados de ácido nordihidroguayarático con 7-hidroxiestaurosorina

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere al uso de los derivados de ácido nordihidroguayarático, ácido tetra-O-metil nordihidroguayarático (M₄N) o ácido maltosa-tri-O-metil nordihidroguayarático (maltosa-M₃N) junto con 7-hidroxiestaurosorina (UCN-01) para tratar el cáncer como se define en las reivindicaciones, prevenir la metástasis, y prolongar la vida de un mamífero que padece un tumor. La descripción también se refiere al uso de los derivados de ácido nordihidroguayarático como protectores celulares.

10 Antecedentes

La carcinogénesis es un suceso de múltiples etapas afectado por una diversidad de factores genéticos y epigenéticos, y está tipificada por la aparición de un crecimiento celular descontrolado originado en diferentes tejidos. Un objetivo universal para la investigación contra el cáncer se basa en el desarrollo de un tratamiento clínico que sea muy eficaz en la restricción del crecimiento tumoral, atóxico para el hospedador, y que sea asequible para la mayoría de los pacientes. Los fármacos que inhiben objetivos que son exclusivos de las células en división, en particular de las células en división de una manera descontrolada, son un paradigma ideal para los agentes quimioterápicos, y cuanto mayor sea la especificidad hacia las células que se están dividiendo de una manera descontrolada, menor será el riesgo de efectos secundarios concomitantes.

Los inventores y colegas han informado previamente que el ácido tetra-O-metil nordihidroguayarático (M₄N), también conocido como EM1421 y terameprocol, un derivado sintetizado semi-químicamente del ácido nordihidroguayarático (NDGA) poseía actividades antivirales (1, 2) y antineoplásicas (3) en células cultivadas, en modelos de ratón (3, 4), y en xenoinjertos humanos en ratones atímicos (5). Como inhibidor de la transcripción, M₄N inhibe la expresión de cdk regulada por Sp1 y provoca la detención del ciclo celular en la fase G2 del ciclo celular (3, 4). Se ha demostrado que la sobreexpresión de Sp1 tiene un papel significativo en el desarrollo y la progresión del cáncer gástrico (6, 7). Se examinó la seguridad y la posible capacidad tumoricida de M₄N para pacientes humanos por medio de aplicaciones intralesionales (8) o tópicas (9). Actualmente se está sometiendo a M₄N a ensayos clínicos de fase I/II en pacientes mediante infusión intravenosa (10). Los datos de los ensayos clínicos, hasta ahora, han indicado que M₄N ha tenido una eficacia antineoplásica sustancial. Sin embargo, los datos también han indicado que sería deseable si se pudiera hallar la manera de fortalecer la actividad antineoplásica del fármaco, ya que la eficacia tumoricida de este fármaco no es lo suficientemente fuerte en la mayoría de los casos. Existen muchos informes que indican que los regímenes farmacológicos de combinación basados en varios fármacos antineoplásicos son eficaces para el tratamiento de ciertos tipos de cánceres (11, 12). En este estudio se exploraron los posibles tratamientos antineoplásicos farmacológicos de combinación basados en M₄N, y se investigó el fundamento mecanístico para una terapia antineoplásica eficaz. Está aceptado de manera generalizada que la inhibición de la muerte celular es una etapa necesaria en la transición desde las células normales hasta las células cancerosas, y la mayoría de las terapias del cáncer ejercen su efecto invirtiendo indirectamente este proceso (13, 14). Se sabe que las mitocondrias son un elemento clave en los mecanismos de la muerte celular. Se considera que la activación de Apaf-1, caspasa-9 y -3, e ICAD (DFF45) por la salida del citocromo c de la mitocondria es el mecanismo más importante para la inducción de la apoptosis (15). Normalmente, la despolarización del potencial de la membrana mitocondrial acompaña a la activación de la señal de muerte celular en las mitocondrias (16, 17). En muchas células cancerosas, el potencial de la membrana mitocondrial está hiperpolarizado en vez de despolarizado, lo cual es una de las muchas indicaciones que implican que el mecanismo de muerte celular a nivel mitocondrial a menudo está alterado en el cáncer (13, 14). Por esta razón, es bastante comprensible por qué muchos esfuerzos en el desarrollo de fármacos antineoplásicos se centran en la normalización de la ruta de la muerte celular asociada a las mitocondrias (18-20). Las proteínas de la familia Bcl-2, que son pro-apoptóticas o anti-apoptóticas, regulan la muerte celular a nivel mitocondrial (21). BNIP-3 es una proteína que pertenece a la familia de proteínas Bcl-2. Esta proteína es una proteína pro-apoptótica que se considera que actúa como mediador en la señal de muerte celular a través de las mitocondrias en condiciones de estrés, muy en particular en condiciones hipóxicas. Debido a que las células cancerosas a menudo están expuestas a condiciones hipóxicas, ya que con frecuencia los tumores no reciben un suministro de oxígeno sanguíneo suficiente, el estudio de esta proteína particular es muy importante para entender la patología del desarrollo y la prevención del cáncer.

En años recientes, muchos investigadores del cáncer han investigado exhaustivamente la autofagia y la muerte celular, al considerar que la explotación de estos dos mecanismos fisiológicos es crucial para establecer regímenes terapéuticos antineoplásicos eficaces (27, 28). En la bibliografía existen pruebas claras a partir de los fenotipos de los ratones mutantes, y de las células derivadas de los ratones, de que la autofagia funciona para mantener la supervivencia celular, en particular durante el estrés (29-36). También está claro que existe una interacción funcional entre la autofagia y las rutas de muerte celular (37, 38). En respuesta al estrés metabólico, la autofagia puede retrasar la muerte celular por apoptosis, y, en las células deficientes de apoptosis, la inactivación de la ruta de supervivencia mediante autofagia estimula la muerte celular necrótica in vitro y en tumores in vivo (29, 31, 38). Considerando este progreso reciente en la investigación del cáncer, en este estudio se abordarán las perspectivas

mecanísticas de la muerte celular y de la autofagia para establecer regímenes farmacológicos de combinación eficaces basados en M₄N.

5 El documento WO-A-2009/089366 describe el uso de una combinación de ácido nordihidroguayarático (NDGA) o sus derivados, preferiblemente M₄N o maltosa-M₃N, en combinación con un inhibidor metabólico para el tratamiento o la prevención del cáncer, que incluye prevenir o inhibir el crecimiento tumoral y prevenir la metástasis tumoral.

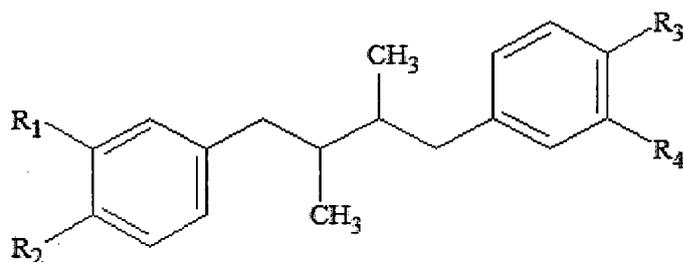
El documento US 2008/207532 enseña que los derivados de NDGA resuelven el problema de la resistencia a fármacos asociada a muchos fármacos citotóxicos.

El documento US 5 541 232 informa de que la combinación de NDGA o análogos y un agente antineoplásico puede superar la multi-resistencia a fármacos (MDR) o incrementar la eficacia del agente antineoplásico.

10 Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. 61/306.680, presentada el 22 de febrero de 2010.

Sumario

15 Como se expone en la presente memoria, se ha usado ácido tetra-O-metil nordihidroguayarático M₄N y ácido maltosa-tri-O-metil nordihidroguayarático en combinación con 7-hidroxiestaurosporina para producir resultados excelentes en el tratamiento de tumores, lo que incluye una supervivencia prolongada de los pacientes así como una citotoxicidad hacia las células cancerosas. Los derivados de ácido nordihidroguayarático (NDGA) se pueden representar mediante la fórmula I:



(I)

20 En la que R₁ R₂ R₃ y R₄ representan independientemente hidroxilo, un alquilo o alcoxi inferior de cadena lineal o ramificada, un residuo de aminoácido, un residuo de aminoácido sustituido, un anillo heterocíclico de 5 ó 6 miembros que contiene nitrógeno o un residuo de sacárido; y el residuo de aminoácido, residuo de aminoácido sustituido, anillo heterocíclico de 5 ó 6 miembros que contiene nitrógeno o residuo de sacárido están unidos opcionalmente al anillo fenilo mediante un ligador de un átomo de oxígeno y 1-10 átomos de carbono, y una cantidad eficaz de 7-hidroxiestaurosporina.

25 Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de ácido tetra-O-metil nordihidroguayarático (M₄N) o ácido maltosa-tri-O-metil nordihidroguayarático (maltosa-M₃N) y una cantidad eficaz de 7-hidroxiestaurosporina.

30 En una realización específica, la composición farmacéutica comprende el derivado de NDGA ácido tetra-O-metil nordihidroguayarático (M₄N). En otra realización específica, la composición farmacéutica comprende el derivado de NDGA maltosa M₃N.

También se proporciona una cantidad eficaz de la composición farmacéutica anteriormente descrita para el uso para tratar un tumor en un mamífero.

35 El mamífero puede ser cualquier mamífero que padece un tumor susceptible de tratamiento, por ejemplo un ser humano, primate distinto de ser humano, gato, perro, ratón, etc. El tumor es un tumor sólido o hematológico, benigno o maligno (metastásico o no metastásico), seleccionado de cánceres de mama, hígado, próstata, ovario y colon, o glioblastoma. El tratamiento es especialmente adecuado para el tratamiento del cáncer metastásico y no metastásico.

También se proporciona una cantidad eficaz de la composición farmacéutica anteriormente descrita para el uso para prevenir o inhibir el crecimiento tumoral en un animal.

40 En una realización específica, el derivado de NDGA es ácido tetra-O-metil nordihidroguayarático (M₄N). En otra realización específica, el derivado de NDGA es maltosa M₃N (90).

El mamífero puede ser cualquier mamífero que padece un tumor susceptible de tratamiento, por ejemplo un ser

humano, primate distinto de ser humano, gato, perro, ratón, etc.

El tumor es un tumor sólido o hematológico, benigno o maligno (metastásico o no metastásico), seleccionado de cánceres de mama, hígado, próstata, ovario y colon, o glioblastoma. El tratamiento es especialmente adecuado para el tratamiento del cáncer metastásico y no metastásico.

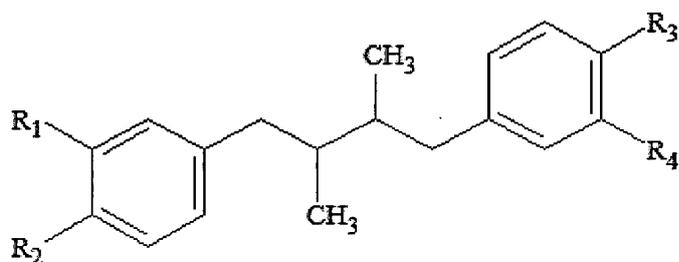
- 5 También se proporciona una cantidad eficaz de la composición farmacéutica anteriormente descrita para el uso para prevenir la metástasis tumoral en un mamífero.

En una realización específica, el derivado de NDGA es ácido tetra-O-metil nordihidroguayarético (M₄N). En otra realización específica, el derivado de NDGA es maltosa M₃N.

- 10 El mamífero puede ser cualquier mamífero que padece un tumor susceptible de tratamiento, por ejemplo un ser humano, primate distinto de ser humano, gato, perro, ratón, etc.

El tumor es un tumor sólido o hematológico seleccionado de cánceres de mama, hígado, próstata, ovario y colon, o glioblastoma. El tratamiento se puede administrar solo o como un adyuvante para la cirugía, p.ej. antes de la cirugía, por ejemplo, para reducir el tamaño del tumor, y/o tras la cirugía para reducir la posibilidad de metástasis, p.ej. mediante la inhibición del crecimiento y la migración de células tumorales circulantes a través del torrente sanguíneo.

- 15 También se describe un método para prolongar la vida de un mamífero que tiene un tumor maligno, y dicho método comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de ácido nordihidroguayarético (NDGA) o un derivado del mismo de fórmula I:



- 20 en la que R₁, R₂, R₃ y R₄ representan independientemente hidroxilo, un alquilo o alcoxi inferior de cadena lineal o ramificada, un residuo de aminoácido, un residuo de aminoácido sustituido y un residuo de sacárido; y el residuo de aminoácido, residuo de aminoácido sustituido o residuo de sacárido están unidos opcionalmente al anillo fenilo mediante un ligador de un átomo de oxígeno y 1-10 átomos de carbono; y una cantidad eficaz de 7-hidroxiestaurosporina.

- 25 En un aspecto específico, el derivado de NDGA es ácido tetra-O-metil nordihidroguayarético (M₄N). En otro aspecto específico, el derivado de NDGA es maltosa M₃N. En otros aspectos específicos, R₁, R₂, R₃ y R₄ son idénticos y representan grupos alcoxi inferiores de cadena lineal o ramificada o residuos de aminoácidos que se dan de manera natural.

El mamífero puede ser cualquier mamífero que padece un tumor susceptible de tratamiento, por ejemplo un ser humano, primate distinto de ser humano, gato, perro, ratón, etc.

- 30 El tumor puede ser un tumor sólido o hematológico, tal como, por ejemplo, cánceres de mama, próstata, cuello del útero, ovario, colon, cerebro, páncreas y pulmón, leucemias y linfomas, y otros tumores mencionados anteriormente en la presente memoria. Los expertos en la técnica podrán determinar mediante experimentación rutinaria los tipos de tumores que son susceptibles de tratamiento.

- 35 También se ha descubierto, tal como se detalla más adelante, que M₄N ejerce un efecto protector en las células normales en estados de enfermedad, y es capaz de proteger a las células normales de los compuestos por otra parte tóxicos durante la quimioterapia. Por lo tanto, otro aspecto de la descripción es un método para prevenir la muerte celular dependiente de caspasa en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno, y dicho método comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de M₄N a dicho sujeto. En un aspecto, la enfermedad o el trastorno es infarto de miocardio. En otro aspecto, la enfermedad o el trastorno es cáncer. En un aspecto específico, la muerte celular dependiente de caspasa provocada por un agente quimioterápico se previene mediante la administración de M₄N.

Formulaciones y administración adecuadas para aplicación IV, IP, tópica y oral.

- 45 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención son útiles para el diagnóstico, pronóstico, profilaxis o tratamiento de una afección. Por lo tanto, las composiciones de acuerdo con la invención son útiles como fármaco o como información para la modificación estructural de compuestos existentes, p.ej., mediante el diseño racional de

fármacos. Los compuestos y métodos de la invención son útiles para compuestos de cribado que tienen efecto sobre una diversidad de afecciones.

5 Para los usos terapéuticos, las composiciones o agentes identificados mediante el uso de los métodos descritos en la presente memoria se pueden administrar de manera sistémica, por ejemplo, formulados en un tampón farmacéuticamente aceptable tal como solución salina fisiológica. Las vías de administración preferibles incluyen, por ejemplo, las inyecciones subcutáneas, intravenosas, intraperitoneales, intramusculares, o intradérmicas que proporcionan niveles continuos, sostenidos del fármaco en el paciente. El tratamiento de pacientes humanos u otros animales se lleva a cabo en general mediante el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico de la invención en un vehículo fisiológicamente aceptable. Los vehículos adecuados y su formulación se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences de E. W. Martin.

10 La cantidad del agente terapéutico a administrar varía dependiendo de la manera de administración, la edad y el peso corporal del sujeto/paciente, y con los síntomas y la afección del sujeto. Un compuesto se administra a una dosis que consigue mejor los objetivos médicos con los mínimos efectos secundarios correspondientes.

Administración

15 Las composiciones farmacéuticas de esta invención, que incluyen fragmentos biológicamente activos, variantes, o análogos de las mismas, se pueden administrar mediante cualquier vía adecuada que incluye la intracraneal, intracerebral, intraventricular, intratecal, intraespinal, oral, tópica, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular o intranasal. En una realización, las composiciones se añaden a un fluido fisiológico retenido, tal como líquido cefalorraquídeo, sangre, o líquido sinovial. Las composiciones de la invención pueden ser susceptibles de inyección o infusión directa en un sitio de enfermedad o lesión.

20 Se pueden proporcionar composiciones para uso parenteral en formas farmacéuticas unitarias (p.ej., en ampollas de dosis unitarias), o en viales que contienen varias dosis y en los que se puede añadir un conservante adecuado. La composición puede estar en forma de una disolución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión, o un dispositivo de administración para implante, o se puede presentar en forma de un polvo seco a reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. La composición puede incluir vehículos y/o excipientes adecuados parenteralmente aceptables.

30 En una aproximación, se proporciona un compuesto terapéutico de la invención en un implante, tal como una bomba osmótica, o en un injerto que comprende células transformadas de manera adecuada. También se pueden proporcionar métodos de introducción mediante dispositivos recargables o biodegradables. Se han desarrollado y ensayado diversos dispositivos poliméricos de liberación lenta para la administración controlada de fármacos, que incluyen productos biofarmacéuticos proteicos. Se puede usar una diversidad de polímeros biocompatibles (que incluyen hidrogeles), que incluyen polímeros tanto biodegradables como no degradables, para formar un implante para la liberación sostenida de un factor bioactivo en un sitio objetivo particular.

35 En general, la cantidad de agente administrado de la invención (dosis) se determinará de manera experimental de acuerdo con la información y los protocolos conocidos en la técnica. En general, se administran agentes en el intervalo de alrededor de 10 µg/kg a 100 mg/kg del receptor. Se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizantes, bactericidas, y anti-fúngicos. Estos aditivos estarán presentes en cantidades convencionales.

40 La administración de un compuesto de la invención se puede realizar mediante cualquier medio adecuado que dé como resultado una concentración del agente terapéutico que, combinado con otros componentes, sea eficaz para mejorar, reducir, o estabilizar un déficit o trastorno. El compuesto puede estar contenido en cualquier cantidad adecuada en cualquier vehículo adecuado, y en general está presente en una cantidad de un 1-95% en peso del peso total de la composición. La composición se puede proporcionar en una forma farmacéutica que es adecuada para la vía de administración parenteral (p.ej., subcutánea, intravenosa, intramuscular, o intraperitoneal).

45 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular según la práctica farmacéutica convencional (véase, p.ej., Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20ª ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York).

Formulación de Composiciones Farmacéuticas

50 Como se indicó anteriormente, las composiciones de la invención se pueden administrar de manera parenteral mediante inyección, infusión o implante (subcutáneo, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, o similares) en formas farmacéuticas, formulaciones, o por medio de dispositivos de administración o implantes adecuados que contienen vehículos y adyuvantes convencionales, atóxicos, farmacéuticamente aceptables. La formulación y preparación de tales composiciones son muy conocidas para los expertos en la técnica de formulaciones farmacéuticas. Se pueden hallar formulaciones en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, citado en la presente memoria.

55 Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas según la invención pueden estar en una forma adecuada para

inyección estéril. Para preparar tal composición, la(s) composición(es) se disuelve(n) o se suspende(n) en un vehículo líquido parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, agua ajustada a un pH adecuado mediante la adición de una cantidad adecuada de ácido clorhídrico, hidróxido sódico o un tampón adecuado, 1,3-butanodiol, disolución de Ringer, y disolución isotónica de cloruro sódico y disolución de dextrosa. La formulación acuosa puede contener también uno o más conservantes (p.ej., p-hidroxibenzoato de metilo, etilo o n-propilo).

Las formas farmacéuticas adecuadas se pueden formular para administración oral, rectal, sublingual, mucosa, nasal, oftálmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, cefalorraquídea, intratecal, intraarticular, intraarterial, subaracnoidea, bronquial, linfática, e intra-uterina, y otras formas farmacéuticas para la administración sistémica de los ingredientes activos. En una realización preferida, la forma farmacéutica es adecuada para inyección o administración intravenosa.

Para preparar tales formas farmacéuticas, se mezclan íntimamente uno o más de los compuestos anteriormente mencionados con un vehículo farmacéutico según las técnicas de producción de compuestos farmacéuticos convencionales. El vehículo puede tener una amplia diversidad de formas dependiendo de la forma de la preparación deseada para la administración.

Para las formulaciones parenterales, el vehículo comprenderá normalmente agua estéril, aunque se pueden incluir otros ingredientes, por ejemplo, ingredientes que contribuyen a la solubilidad o la conservación. También se pueden preparar disoluciones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear agentes estabilizantes adecuados.

Al preparar las composiciones en una forma farmacéutica oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales. Así, para las preparaciones orales líquidas, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y disoluciones, los vehículos y aditivos adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. Para las preparaciones orales sólidas tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos, los vehículos y aditivos adecuados incluyen almidones, hidratos de carbono, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma farmacéutica unitaria oral más ventajosa. Si se desea, los comprimidos se pueden revestir con hidratos de carbono o con un revestimiento entérico mediante las técnicas habituales.

En ciertas aplicaciones, puede ser ventajoso utilizar el agente activo en una forma "vectorizada", tal como mediante encapsulación del agente activo en un liposoma u otro medio de encapsulación, o mediante fijación del agente activo, p.ej., mediante formación de enlaces covalentes, quelación, o coordinación asociativa, sobre una biomolécula adecuada, tal como las seleccionadas de proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, y polisacáridos.

De acuerdo con la presente invención, las formulaciones adecuadas para administración oral se pueden presentar en forma de unidades discretas tales como cápsulas, obleas, comprimidos, o pastillas, y cada una contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo en forma de un polvo o gránulos. Opcionalmente, se puede emplear una suspensión en un licor acuoso o un líquido no acuoso, tal como un jarabe, un elixir, una emulsión, o una poción.

Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen el/los ingrediente(s) activo(s) de la invención mezclados con excipientes farmacéuticamente aceptables. Tales formulaciones son conocidas para el técnico experto. Los excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes o rellenos (p.ej., sacarosa, sorbitol, hidratos de carbono, manitol, celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, carbonato cálcico, cloruro sódico, lactosa, fosfato cálcico, sulfato cálcico, o fosfato sódico); agentes de granulación y desintegración (p.ej., derivados de celulosa que incluyen celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, croscarmelosa sódica, alginatos, o ácido algínico); agentes aglutinantes (p.ej., sacarosa, glucosa, sorbitol, goma arábica, ácido algínico, alginato sódico, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, silicato de magnesio-aluminio, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona, o polietilen glicol); y agentes lubricantes, deslizantes, y antiadhesivos (p.ej., estearato de magnesio, estearato de zinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados, o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes aromatizantes, plastificantes, humectantes, agentes tamponadores, y similares.

Según sea adecuado, se puede hacer un comprimido mediante compresión o moldeado, o granulación en húmedo, opcionalmente con uno o más ingredientes secundarios. Los comprimidos mediante compresión se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada, con el compuesto activo en una forma fluida tal como un polvo o gránulos, que opcionalmente se mezcla con un aglutinante, desintegrante, lubricante, diluyente inerte, agente tensioactivo o agente de descarga. Los comprimidos moldeados que constan de una mezcla del compuesto activo en polvo con un vehículo adecuado se pueden hacer moldeando en una máquina adecuada.

Según sea adecuado, se puede hacer un jarabe añadiendo el compuesto activo a una disolución acuosa concentrada de un hidrato de carbono, por ejemplo sacarosa, a la que también se le puede añadir cualquier ingrediente(s) accesorio(s). Tal(es) ingrediente(s) accesorio(s) puede(n) incluir aromatizantes, conservantes adecuados, agentes para retrasar la cristalización del hidrato de carbono, y agentes para incrementar la solubilidad

de cualquier otro ingrediente, tal como un alcohol polihidroxílico, por ejemplo glicerol o sorbitol.

5 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral comprenden normalmente una preparación acuosa estéril del compuesto activo, que preferiblemente es isotónica con la sangre del receptor (p.ej., solución salina fisiológica). Tales formulaciones pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes y liposomas u otros sistemas microparticulados que se diseñan para dirigir al compuesto a componentes sanguíneos o a uno o más órganos. Las formulaciones se pueden presentar en forma de dosis unitaria o de dosis múltiple.

10 La administración parenteral puede comprender cualquier forma adecuada de administración sistémica o administración localizada. La administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, intra-arterial, intratecal, intramuscular, subcutánea, intramuscular, intra-abdominal (p.ej., intraperitoneal), etc., y se puede efectuar mediante bombas de infusión (externas o implantables) o cualquier otro medio adecuado apropiado para la modalidad de administración deseada.

15 Las formulaciones nasales y otras en aerosoles mucosos (p.ej. formas inhalables) pueden comprender disoluciones acuosas purificadas de los compuestos activos con agentes conservantes y agentes isotónicos. Tales formulaciones se ajustan preferiblemente a un pH y un estado isotónico compatibles con las membranas mucosas nasales u otras membranas mucosas. De manera alternativa, pueden estar en forma de polvos sólidos finamente divididos suspendidos en un vehículo gaseoso. Tales formulaciones se pueden administrar mediante cualquier medio o método adecuado, p.ej., mediante nebulizador, atomizador, inhalador de dosis medida, o similares.

Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar en forma de un supositorio con un vehículo adecuado, tal como manteca de cacao, grasas hidrogenadas o ácidos grasos carboxílicos hidrogenados.

20 Las formulaciones transdérmicas se pueden preparar incorporando el agente activo en un vehículo tixotrópico o gelatinoso tal como un medio celulósico, p.ej., metil celulosa o hidroxietil celulosa, y la formulación resultante se envasa después en un dispositivo transdérmico adaptado para sujetarlo en contacto dérmico con la piel de un usuario.

25 Además de los ingredientes anteriormente mencionados, las formulaciones de la invención pueden incluir además uno o más ingrediente(s) accesorio(s) seleccionado(s) de disolventes, tampones, agentes aromatizantes, aglutinantes, desintegrantes, agentes tensioactivos, espesantes, lubricantes, conservantes (que incluyen antioxidantes), y similares.

30 Una formulación de la presente invención puede tener una liberación inmediata, liberación sostenida, liberación de inicio retardado o cualquier otro perfil de liberación conocido para un experto en la técnica. Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden formular para liberar el compuesto activo sustancialmente inmediatamente tras la administración o en cualquier momento o periodo de tiempo predeterminado tras la administración. El segundo tipo de composiciones se conocen en general como formulaciones de liberación controlada, que incluyen (i) formulaciones que crean una concentración sustancialmente constante del fármaco en el cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado; (ii) formulaciones que tras un intervalo de tiempo predeterminado crean una concentración sustancialmente constante del fármaco en el cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado; (iii) formulaciones que mantienen la acción durante un periodo de tiempo predeterminado manteniendo un nivel eficaz relativamente constante en el cuerpo con una minimización concomitante de los efectos secundarios indeseables asociados a las fluctuaciones del nivel plasmático de la sustancia activa (patrón cinético de dientes de sierra); (iv) formulaciones que localizan la acción, p.ej., mediante la colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente o en el sistema nervioso central o líquido cefalorraquídeo; (v) formulaciones que permiten una dosificación práctica, de forma que se administran las dosis, por ejemplo, una vez cada una o dos semanas; y (vi) formulaciones que seleccionan como objetivo el sitio de una patología. Para ciertas aplicaciones, las formulaciones de liberación controlada evitan la necesidad de administrar dosis frecuentes para mantener la actividad enzimática a un nivel terapéutico.

45 Se puede aplicar cualquiera de varias estrategias para conseguir una liberación controlada en la que la velocidad de liberación tenga un peso mayor que la velocidad del metabolismo del compuesto en cuestión. En un ejemplo, se obtiene la liberación controlada mediante la selección adecuada de diversos parámetros e ingredientes de la formulación, que incluyen, p.ej., diversos tipos de composiciones de liberación controlada y revestimientos. Así, el agente terapéutico se formula con excipientes adecuados en una composición farmacéutica que, tras la administración, libera el agente terapéutico de una manera controlada. Los ejemplos incluyen composiciones de comprimidos o cápsulas unitarias o múltiples, disoluciones en aceite, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, complejos moleculares, nanopartículas, parches, y liposomas.

55 Las composiciones de la invención se pueden incorporar en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas, o similares para la liberación controlada. Además, la composición puede incluir agentes de suspensión, solubilizantes, estabilizantes, agentes de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, y/o agentes dispersantes. De manera alternativa, el fármaco activo se puede incorporar en vehículos biocompatibles, implantes, o dispositivos de infusión.

Los materiales para el uso en la preparación de microesferas y/o microcápsulas son, p.ej., polímeros

biodegradables/bioerosionables tales como poligalactina, poli-(cianoacrilato de isobutilo), poli(2-hidroxietil-L-glutamina), y poli(ácido láctico). Los vehículos biocompatibles que se pueden usar al formular una formulación parenteral de liberación controlada son hidratos de carbono (p.ej., dextranos), proteínas (p.ej., albúmina), lipoproteínas, o anticuerpos. Los materiales para el uso en implantes pueden ser no biodegradables (p.ej., polidimetil siloxano) o biodegradables (p.ej., poli(caprolactona), poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) o poli(orto ésteres), o combinaciones de los mismos).

Sales y Derivados

Las composiciones de la descripción pueden comprender diversas sales farmacéuticamente aceptables, derivados de éteres, derivados de ésteres, derivados de ácidos, y derivados que alteran la solubilidad acuosa del compuesto activo. La presente descripción puede comprender todos los enantiómeros individuales, diastereómeros, racematos, y otros isómeros de los compuestos de la descripción. La descripción también incluye todos los polimorfos y solvatos, tales como hidratos y los formados con disolventes orgánicos, de este compuesto. Tales isómeros, polimorfos, y solvatos se pueden preparar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mediante síntesis regioespecífica y/o enantioselectiva y resolución, basándose en la descripción proporcionada en la presente memoria.

Las sales adecuadas del compuesto incluyen las sales de adición de ácido, tales como las hechas con ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, perclórico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, acético, propiónico, glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, benzoico, carbónico, cinámico, mandélico, metanosulfónico, etanosulfónico, hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, p-tolueno sulfónico, ciclohexanosulfámico, salicílico, p-aminosalicílico, 2-fenoxibenzoico, y 2-acetoxibenzoico; sales hechas con sacarina; sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio y potasio; sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio y magnesio; y sales formadas con ligandos orgánicos o inorgánicos, tales como sales de amonio cuaternario.

Las sales adecuadas adicionales incluyen las sales de acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bisulfato, bitartrato, borato, bromuro, edetato cálcico, camsilato, carbonato, cloruro, clavulanato, citrato, dihidrocloruro, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, hidrobromuro, hidrocioruro, hidroxinaftoato, yoduro, isotionato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrito, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, sal de N-metilglucamina amonio, oleato, pamoato (embonato), palmitato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, sulfato, subacetato, succinato, tanato, tartrato, teoclato, tosilato, trietyoduro y valerato del compuesto de la presente descripción.

También se describen los profármacos y metabolitos activos de los compuestos de la descripción.

Un profármaco es un compuesto farmacológicamente inactivo que se convierte en un agente farmacológicamente activo mediante una transformación metabólica. In vivo, la(s) enzima(s) natural(es) actúa(n) sobre un profármaco, lo que da como resultado la liberación del agente farmacológicamente activo. Se describen procedimientos convencionales para la selección y preparación de derivados de profármacos adecuados, por ejemplo, en "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Un metabolito activo es un compuesto que resulta del metabolismo de otro compuesto tras la administración de este último a un sujeto. Los metabolitos se pueden identificar mediante métodos muy conocidos en la técnica.

La descripción también comprende equipos, p.ej., para el tratamiento, diagnóstico, profilaxis o pronóstico de una enfermedad o lesión. En un aspecto, el equipo incluye una composición de la invención que contiene una cantidad eficaz de un compuesto de la invención en una forma farmacéutica unitaria. En ciertos aspectos, el equipo comprende un recipiente o envase externo. El equipo puede comprender un recipiente estéril que contiene un agente terapéutico; tales recipientes estériles pueden ser cajas, ampollas, botellas, viales, tubos, bolsas, envases de tipo blíster, u otras formas de recipientes adecuados conocidos en la técnica. Tales recipientes pueden estar hechos de plástico, vidrio, papel laminado, hoja de metal, u otros materiales adecuados para albergar medicamentos.

En ciertos aspectos de los equipos, se proporciona una composición de la invención junto con instrucciones para administrarla a un sujeto. Las instrucciones pueden incluir información sobre el uso y los efectos de la composición. En un aspecto, las instrucciones incluirán al menos uno de lo siguiente: descripción de una composición de la invención, calendario de dosis y protocolos de administración, precauciones, advertencias, indicaciones, contraindicaciones, información de sobredosis, reacciones adversas, farmacología animal, estudios clínicos, y/o referencias. Las instrucciones pueden estar impresas directamente sobre un recipiente (si está presente), o como una etiqueta aplicada en el recipiente, o como una hoja por separado, folleto, tarjeta, o carpeta suministrada en, sobre o con el recipiente. Así, las instrucciones pueden ser un artículo separado del equipo, o pueden estar impresas, estampadas, moldeadas o pegadas de otra manera a otro artículo del equipo; las instrucciones pueden estar impresas en un recipiente externo y también incluidas en forma de un artículo insertado en el equipo.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones.

Descripción breve de los dibujos

Solamente las combinaciones de M₄N con UCN-01 para el tratamiento del cáncer de mama, próstata, colon, hepático u ovárico o glioblastoma están de acuerdo con la invención.

Figura 1. Inducción sinérgica de la muerte celular TUNEL-positiva mediante los tratamientos de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01 en células LNCaP de cáncer de próstata humano. A: Inducción sinérgica de la muerte celular mediante los tratamientos de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01 en células LNCaP. Las células LNCaP se trataron con M₄N en combinación con etopósido, rapamicina o UCN-01, respectivamente, a diversas concentraciones de fármacos. La muerte celular se midió mediante el ensayo TUNEL a las 24 hrs (etopósido, rapamicina) o 18 hrs (UCN-01) tras el tratamiento. Los datos se presentan como medias (+/-) DE por triplicado. B: La representación de Chou-Talalay para los tratamientos de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01 en células LNCaP. El índice de combinación (IC) <1, +1, y >1 indica sinergia, efecto aditivo, y antagonismo. C: La escisión de caspasa-3, -7 y -9, e ICAD en células LNCaP tratadas mediante los tratamientos de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01. Las proteínas escindidas se detectaron mediante transferencia de Western en células LNCaP tratadas durante 17 hrs. La concentración de M₄N, etopósido, rapamicina, y UCN-01 fue 80 μM, 10 μM, 10 μM, y 2 μM, respectivamente. Se usó β-actina como control. E: etopósido, Ra: rapamicina, U: UCN-01, M: M₄N. D: Actividad enzimática de caspasa-7 en células LNCaP tratadas mediante los tratamientos de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01. La actividad enzimática de caspasa-7 se detectó en los extractos celulares de células LNCaP tratadas durante 13 hrs. (-): control, E: etopósido, Ra: rapamicina, U: UCN-01. E: El efecto de z-DEVD-fmk sobre la muerte celular TUNEL-positiva inducida mediante el tratamiento de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01. La muerte celular se midió a las 24 hrs tras el tratamiento. La concentración de z-DEVD-fmk, M₄N, etopósido, rapamicina, y UCN-01 fue 50 μM, 80 μM, 10 μM, 20 μM, y 2 μM, respectivamente. F: El efecto de una construcción de PKCδ negativa dominante sobre la muerte celular TUNEL-positiva inducida mediante el tratamiento de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01. La muerte celular se midió a las 24 horas tras el tratamiento. La concentración de M₄N, etopósido, rapamicina, y UCN-01 fue 80 μM, 20 μM, 20 μM, y 2 μM, respectivamente.

Figura 2. A: La expresión de LC3B en células LNCaP tratadas con el fármaco de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01, detectada mediante transferencia de Western. Se examinó la expresión de LC3B-I y II mediante transferencia de Western en células LNCaP tratadas con el tratamiento de combinación de M₄N con tres fármacos diferentes (etopósido, rapamicina, y UCN-01) durante 18 hrs en presencia o ausencia de Baflomicina A₁ (100 nM), un inhibidor de la degradación de autofagosomas. La concentración de M₄N, etopósido, rapamicina, y UCN-01 fue 80 μM, 10 μM, 10 μM, y 2 μM, respectivamente. Se usó β-actina como control. C: Control, E: etopósido, Rap: rapamicina, U: UCN-01, Baf: Baflomicina A₁. B: La expresión de LC3B en células LNCaP tratadas con el fármaco de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01, detectada mediante microscopía confocal. La expresión de LC3B se examinó mediante microscopía confocal para las células LNCaP tratadas con el tratamiento de combinación de M₄N con tres fármacos diferentes (etopósido, rapamicina, y UCN-01) durante 6 hrs en presencia de Baflomicina A₁ (100 nM), un inhibidor de la degradación de autofagosomas, y teñidas con anticuerpo anti-LC3B mediante una metodología inmunocitoquímica. La tinción de LC3B se realizó mediante tinción con FITC (verde). La concentración de M₄N, etopósido, rapamicina, y UCN-01 fue 80 μM, 10 μM, 10 μM, y 2 μM, respectivamente. Para la imagen de control, véase la Figura 4A. Eto: etopósido, Rap: rapamicina, U: UCN-01, M: M₄N, Baf: Baflomicina A₁.

Figura 3. A: El efecto de M₄N y la hipoxia sobre la expresión de HIF1α, BNIP3, BNIP3L, y Beclina-1. Se examinó la expresión de HIF1α, BNIP3, BNIP3L, y Beclina-1 mediante transferencia de Western en células LNCaP tratadas con M₄N en condiciones normóxicas o hipóxicas durante 6 ó 18 hr. La concentración de M₄N fue 80 μM. Se usó β-actina como control. C: Control, M: M₄N, Hip: condiciones hipóxicas. B: El efecto de M₄N y la hipoxia sobre la expresión de mRNA del gen de BNIP3 a las 2 y 6 hrs tras el tratamiento. Se examinó la expresión de mRNA del gen de BNIP3 mediante transferencia de Northern en células LNCaP tratadas con M₄N en condiciones normóxicas o hipóxicas durante 2 ó 6 hr. La concentración de M₄N fue 80 μM. Se usó β-actina como control. C: Control, M: M₄N, Hip: condiciones hipóxicas. C: El efecto de M₄N sobre el potencial de la membrana mitocondrial (ΔΨ_m). El ΔΨ_m se midió a las 5 hrs tras el tratamiento con M₄N (80 μM) mediante el uso del colorante JC-1. Se calculó la proporción de la intensidad de la luz de emisión excitada mediante luz de 568 nm respecto de la de la luz de emisión excitada mediante luz de 488 nm en cada píxel de las imágenes (la proporción debería indicar el potencial mitocondrial) mediante el programa informático de formación de imágenes (Carl Zeiss, Thornwood, NY). En la figura, la proporción se mostró mediante un falso color. El color rojo indica una proporción elevada (potencial elevado) mientras el azul oscuro indica una proporción baja (potencial bajo). De amarillo pasando por verde hasta azul claro representa una proporción media (potencial medio).

Figura 4. Efecto de los tratamientos de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01 sobre la muerte celular y la autofagia en células de cáncer de mama humano MCF-7 y de cáncer hepático humano HepG2. A: Inducción sinérgica de la muerte celular mediante los tratamientos de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01 en células MCF-7. Las células MCF-7 se trataron con M₄N en combinación con etopósido, rapamicina o UCN-01, respectivamente, a diversas concentraciones de fármacos. La muerte celular se midió mediante el ensayo TUNEL a las 23 hrs (rapamicina, UCN-01) o 32 hrs (etopósido) tras el tratamiento. Los datos se presentan como medias (+/-) DE por triplicado. B: La representación de Chou-Talalay para los tratamientos de

combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01 en células MCF-7. El índice de combinación (IC) < 1, +1, y > 1 indica sinergia, efecto aditivo, y antagonismo. C: Inducción sinérgica de la muerte celular mediante los tratamientos de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01 en células HepG2. Las células HepG2 se trataron con M₄N (80 µM) en combinación con etopósido (20 µM), rapamicina (20 µM) o UCN-01 (5 µM), respectivamente, a diversas concentraciones de los fármacos. Se midió la muerte celular mediante el ensayo TUNEL 24 horas tras el tratamiento. Los datos se presentan como medias (+/-) DE por triplicado. D: La expresión de LC3B en células MCF-7 y HepG2 tratadas con el fármaco de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01, detectada mediante transferencia de Western. Se examinó la expresión de LC3B-I y II mediante transferencia de Western en células MCF-7 y HepG2 tratadas con el tratamiento de combinación de M₄N con tres fármacos diferentes (etopósido, rapamicina, y UCN-01) durante 15 hrs en presencia o ausencia de Baflomicina A₁ (100 nM), un inhibidor de la degradación de autofagosomas. La concentración de M₄N, etopósido, rapamicina, y UCN-01 fue 80 µM, 20 µM, 20 µM, y 5 µM, respectivamente. Se usó β-actina como control. C: Control, E: etopósido, Rap: rapamicina, U: UCN-01, Baf: Baflomicina A₁. E: La escisión de caspasa-3, -7 y -9, en células MCF-7 y HepG2 tratadas mediante los tratamientos de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01. Las proteínas escindidas se detectaron mediante transferencia de Western en células MCF-7 y HepG2 tratadas durante 17 hrs. La concentración de M₄N, etopósido, rapamicina, y UCN-01 fue 80 µM, 20 µM, 20 µM, y 5 µM, respectivamente. Se usó β-actina como control. E: etopósido, Ra: rapamicina, U: UCN-01, M: M₄N.

Figura 5. Efecto del tratamiento de combinación de M₄N con etopósido o rapamicina sobre ratones atímicos (nu/nu) a los que se les implantaron ortotópicamente tumores LNCaP. Los tumores LNCaP se implantaron ortotópicamente cerca de las glándulas prostáticas en ratones atímicos macho. A: Efecto del tratamiento de combinación de M₄N con etopósido o rapamicina sobre la duración de la vida de ratones que albergaban tumores. Se mostró el porcentaje de ratones que habían muerto en la fecha tras la inoculación de los tumores para cada grupo. El número de ratones en cada grupo fue 18, 5, 4, 4, 9 y 5 para el grupo de control, etopósido solo, rapamicina sola, M₄N solo, M₄N y etopósido, y M₄N y rapamicina, respectivamente. Las dosis de cada inyección fueron 1 mg/inyección (para M₄N), 0,4 mg/inyección (para etopósido), y 0,375 mg/inyección (para rapamicina). Las inyecciones de fármacos se iniciaron 3 días tras la implantación de los tumores. Los fármacos se administraron 7 días a la semana durante cuatro semanas. Después, los fármacos se inyectaron una vez a la semana. B: Imágenes histológicas del pulmón de los ratones que albergaban tumores tratados con diferentes métodos. Los cortes de los pulmones se tiñeron con hematoxilina y eosina y se observaron a un aumento de 100x. M indica lesiones metastásicas. Cont, Eto, Rap, M₄N, M₄N+Ly, M₄N+Ro+Ly, M₄N+Eto, y M₄N+Rap indican "control", "Etopósido solo", "Rapamicina sola", "M₄N solo", "combinación de M₄N y Ly294002", "combinación de M₄N, Rottlerina, y Ly294002", "combinación de M₄N y Etopósido", y "combinación de M₄N y Rapamicina".

Figura 6. Muerte celular TUNEL-positiva inducida mediante el tratamiento de combinación de M₄N/UCN-01 en diversas líneas celulares de cáncer. La muerte celular se examinó mediante ensayo TUNEL en diversas líneas celulares de cáncer tratadas con M₄N y UCN-01 durante 24 ó 48 hrs. La concentración de M₄N es 40 ó 80 µM. La concentración de UCN-01 es 1, 2, 3, 4, 5, o 10 µM. Las condiciones exactas se describen en cada figura. Los datos se presentan como medias (+/-) DE por triplicado.

Figura 7. Efecto del tratamiento de combinación de M₄N/UCN-01 sobre la tasa de supervivencia de ratones atímicos que albergaban tumores OC24. Se inocularon de manera intraperitoneal a ratones atímicos (nu/nu) macho deficientes de células T 5x10⁴ células OC24 de cáncer ovárico humano por ratón. Tres días tras la implantación de los tumores, se inició el tratamiento con fármacos. Los compuestos se inyectaron de manera intravenosa en la vena de la cola de los ratones a la dosis diaria de 0,1 ml por ratón. Una inyección contiene 1 mg de M₄N, 88,4 µg de UCN-01, 1 mg de M₄N y 88,4 µg de UCN-01, o el vehículo solo. Las inyecciones de fármacos se llevaron a cabo una vez al día después del día 3 hasta el día 25 tras la implantación de los tumores. Después de ello, las inyecciones de fármacos se llevaron a cabo una vez cada tres días hasta el día 35. El número de ratones usados fue 7, 6, 5, y 7 para el grupo de control, de M₄N, de UCN-01, y del tratamiento de combinación, respectivamente.

Figura 8. Efecto del tratamiento de combinación de M₄N/UCN-01 sobre ratones que albergaban tumores de cáncer ovárico humano OC24 en casos típicos. A: Ejemplos de tumores abdominales de los que se midieron los pesos para estimar la eficacia antineoplásica de M₄N/UCN-01. Se enumeran en las Tablas I y II el número actual para el peso de los tumores, el volumen de líquido ascítico, y el peso de los ratones en todos los ratones que albergaban tumores que se examinaron. Aquí, se muestran las fotografías de los tumores abdominales sólidos obtenidas de los ratones en tres casos típicos (ratones n° 2 y n° 4 de control; ratón n° 3 con M₄N). Normalmente, este tipo de tumores sólidos se forman alrededor de la región abdominal en la que se inocularon en un principio las células OC24 en el peritoneo. B: Fotografías del tumor abdominal en el ratón n° 5 tratado con M₄N y UCN-01. Las fotografías de la región abdominal del ratón n° 5 que se trató con M₄N y UCN-01 se tomaron a los 22, 26, 29, 33, y 43 días tras la inoculación del tumor. El tumor abdominal sólido se indicó mediante un círculo negro. C: Efecto del tratamiento de combinación de M₄N/UCN-01 sobre el volumen de líquido ascítico y el tamaño del tumor abdominal (mostrado en la Figura 8B anterior) en el ratón n° 5 tratado con M₄N y UCN-01.

Descripción detallada y ejemplos

Definiciones:

"Agente" significa un polipéptido, péptido, molécula de ácido nucleico, molécula pequeña, o molécula mimética.

"Análogo" significa un agente que tiene una homología estructural o funcional respecto de un agente de referencia.

"Sustrato celular" significa el material celular o acelular (p.ej., matriz extracelular, polipéptidos, péptidos, u otros componentes moleculares) que está en contacto con la célula.

5 "Control" significa una condición estándar o de referencia.

"Enfermedad" significa cualquier afección o trastorno que daña o interfiere con la función normal de una célula, tejido, órgano o sujeto.

10 "Cantidad eficaz" significa la cantidad de un agente necesaria para mejorar los síntomas de una enfermedad respecto de un paciente sin tratar. La cantidad eficaz de un agente terapéutico activo usado para poner en práctica la presente invención para el tratamiento de una enfermedad o lesión varía dependiendo de la manera de administración, la edad, el peso corporal, y la salud general del sujeto. En última instancia, el médico que aplica el tratamiento decidirá la cantidad adecuada y el régimen de dosis.

15 "Fragmento" significa una porción de un polipéptido que tiene al menos un 50% de la actividad biológica del polipéptido del que deriva. Esta porción contiene, preferiblemente, al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% de la longitud completa de la molécula de ácido nucleico o polipéptido de referencia. Un fragmento de un polipéptido o de una molécula de ácido nucleico puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 nucleótidos o aminoácidos.

"HIF" se refiere a factor inducible por hipoxia-1

20 "M₄N" se refiere a ácido tetra-O-metil nordihidroguayarático, EM1421 o Terameprocol, cada uno de los cuales son sinónimos.

"Alquilo inferior" y "alcoxi inferior" se refieren a grupos alquilo y alcoxi de 1-6 átomos de carbono.

"Modifica" significa altera. En el contexto de la invención, un agente que modifica una célula, sustrato, o medio celular produce una alteración bioquímica en un componente (p.ej., polipéptido, nucleótido, o componente molecular) de la célula, sustrato, o medio celular.

25 Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "prevenir", "prevención", "tratamiento profiláctico" y similares se refieren a reducir la probabilidad de desarrollar un trastorno o afección en un sujeto que no tiene, pero que corre el riesgo o es susceptible de desarrollar, un trastorno o afección.

Tal como se usa en la presente memoria, un "profármaco" es un compuesto farmacológicamente inactivo que se convierte en un agente farmacológicamente activo mediante una transformación metabólica.

30 "Sujeto" significa un mamífero, que incluye, pero sin limitación, un ser humano o mamífero no humano, tal como un mamífero bovino, equino, canino, ovino, o felino.

"Dispositivo de administración terapéutica" significa cualquier dispositivo que proporciona la liberación de un agente terapéutico. Los dispositivos de administración terapéutica ejemplares incluyen bombas osmóticas, catéteres permanentes, y biomateriales de liberación sostenida.

35 Tal como se usa en la presente memoria, los términos "tratar", "tratamiento" y similares se refieren a reducir o mejorar un trastorno y/o los síntomas asociados a él. Se apreciará que, aunque no se excluye, tratar un trastorno o afección no requiere que el trastorno, afección o los síntomas asociados a él se eliminen completamente.

40 "Variante" significa un agente que tiene homología estructural respecto de un agente de referencia, pero varía de la referencia en su actividad biológica. Las variantes proporcionadas por la invención incluyen secuencias optimizadas de aminoácidos y de ácido nucleico que se seleccionan mediante el uso de los métodos descritos en la presente memoria por tener una o más características deseables.

Tal como se usa en la presente memoria, "inhibir" significa reducir o detener el crecimiento.

45 Tal como se usa en la presente memoria, "con" o "junto con" significa que los compuestos se administran durante el mismo curso de tratamiento, pero no necesariamente de manera simultánea. La administración se puede dar con una separación de segundos, minutos, u horas, pero preferiblemente se espaciara estrechamente (al menos minutos). Los compuestos se deberían administrar durante una duración suficiente (p.ej. diariamente) de forma que se alcance una dosis eficaz en plasma y en las células tumorales seleccionadas como objetivo.

Materiales y Métodos

Cultivo Celular

Se adquirieron líneas celulares de cáncer de próstata humano LNCaP, cáncer de próstata humano DU145, cáncer de próstata humano PC3, cáncer de mama humano MCF-7, cáncer de mama humano MDA-MB-231, cáncer de mama humano MDA-MB-468, cáncer de colon humano HT29, leucemia mielógena humana K562, hepatoma humano HepG2, hepatoma humano Hep3B, y glioblastoma humano LN229 de la American Type Culture Collection (Manassas, Va.). La línea celular de cáncer ovárico humano con ascitis OC24 fue una generosa donación del Dr. XXX (Universidad Johns Hopkins, MD). La línea celular LNCaP se cultivó en medio RPMI1640 complementado con glucosa (14 mM), piruvato (1 mM), y suero bovino fetal (FBS) (10%). La línea celular DU145 se cultivó en MEM complementado con aminoácidos no esenciales, glucosa (21 mM), piruvato (1 mM), y FBS (10%). La línea celular PC3 se cultivó en medio F-12K complementado con FBS (10%). La línea celular MCF-7 se cultivó en DMEM complementado con FBS (10%). La línea celular OC24 se cultivó en medio RPMI1640 complementado con FBS (10%) en forma de un cultivo en suspensión. Las líneas celulares MDA-MB-231 y 468 se cultivaron en medio L15 de Leibovitz complementado con FBS (10%) con aire. La línea celular HT29 se cultivó en DMEM complementado con glucosa (25 mM) y FBS (10%). La línea celular K562 se cultivó en RPMI1640 complementado con FBS (10%). Las líneas celulares HepG2 y Hep3B se cultivaron en MEM complementado con FBS (10%). La línea celular LN229 se cultivó en DMEM complementado con FBS (5%). Todos los medios de cultivo de tejidos contuvieron penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycin (100 g/ml). Los fármacos se disolvieron en sulfóxido de dimetilo a las concentraciones finales en el medio menos del 0,1%. Cuando se indicó que las células se debían cultivar en condiciones hipóxicas, las células se incubaron a una concentración de oxígeno del 0,5% en la cámara hipóxica (BioSpherix Ltd, Lacona, NY).

20 Reactivos

Terameprocol (M_4N) (10 mg/ml en formulación de CPE 25/30) fue suministrado por Erimos Pharmaceutical, L.L.C. (Raleigh, NC), según el método descrito (39). Etopósido, rapamicina, UCN-01, y Baflomicina A_1 fueron todos de Sigma (Saint Louis, MO). El anticuerpo policlonal de conejo anti-factor inducible por hipoxia (HIF)1 α fue de Novus Biologicals (Littleton, CO). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-BNIP3 fue de Abcam (Cambridge, MA). Los anticuerpos policlonales anti-caspasa-9 (completa y escindida), anti-caspasa-3 escindida, anti-ICAD escindido, anti-LC3B, anti-Beclina-1 fueron todos de Cell Signaling Technology. Los anticuerpos policlonales de conejo anti-caspasa-7 (completa y fragmento p34 escindido) y anticuerpo anti-caspasa-7 específico del fragmento p20 fueron de Cell Signaling Technology. El anticuerpo policlonal anti-BNIP3L fue de Exalpha Biologicals (Watertown, MA). El anticuerpo monoclonal anti- β -actina fue de Sigma (Saint Louis, MO). zDEVD-fmk fue de Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA).

Análisis informático sobre la sinergia entre fármacos

La sinergia de los tratamientos farmacológicos de combinación se analizó mediante el programa informático Combosyn (Combosyn Inc., Paramus, NJ), según la metodología de Chou y Talalay (40).

Tratamientos con fármacos para animales

Los ratones atímicos (nu/nu) macho deficientes de células T se obtuvieron de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Se formuló etopósido (4 mg/ml), rapamicina (3,75 mg/ml), UCN-01 (884 g/ml), y M_4N (Terameprocol, 10 mg/ml) por separado en vehículo de CPE 25/30 (28) y se usaron como fármacos individuales. Para las combinaciones de fármacos (M_4N /etopósido, M_4N /rapamicina, y M_4N /UCN-01), se añadieron además etopósido, rapamicina, o UCN-01 en polvo a M_4N en CPE 25/30 para producir una concentración final de M_4N (10 mg/ml) respectivamente con etopósido (4 mg/ml), rapamicina (3,75 mg/ml), o UCN-01 (884 g/ml) en una formulación de CPE 25/30. Estos fármacos se inyectaron de manera intravenosa en la vena de la cola de los ratones a la dosis diaria de 0,1 ml por ratón. Por lo tanto, las dosis de cada inyección fueron 1 mg/inyección (para M_4N), 0,4 mg/inyección (para etopósido), 0,375 mg/inyección (para rapamicina), y 88,4 μ g/inyección (para UCN-01). Las inyecciones de fármacos se llevaron a cabo una vez al día; comenzando en el día 3 hasta el día 31 tras la inoculación de los tumores para el tratamiento de combinación con etopósido o rapamicina y hasta el día 25 tras la inoculación de los tumores para el tratamiento de combinación con UCN-01. Después de esto, los fármacos se inyectaron una vez a la semana para el tratamiento de combinación de etopósido/rapamicina y una vez cada tres días hasta el día 35 para el tratamiento de combinación con UCN-01. Los protocolos usados en este estudio fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales en la Universidad Johns Hopkins, Departamento de Biología.

Implantación ortotópica quirúrgica de tumores LNCaP

Las células LNCaP que crecían de manera subconfluyente se transfirieron al medio de cultivo de tejidos sin suero bovino fetal ni antibióticos. La concentración de células se ajustó mediante el mismo medio. Después de haber mezclado cincuenta μ l del medio que contenía cierto número de células cancerosas (alrededor de 2×10^6 células) junto con el mismo volumen de Matrigel (BD Science, Bedford, MA), la disolución combinada se inyectó en la piel de ratones atímicos. El tejido tumoral que crecía de manera subcutánea se usó para la implantación ortotópica quirúrgica. La operación se llevó a cabo según el método descrito por Wang et al. (41). El tejido tumoral extraído de la piel se extirpó en fragmentos de alrededor de 2 mm de diámetro. Después de anestesiarse a los ratones atímicos con 2,2,2-Tribromoetanol (Aldrich Chemical Co. Inc., Milwaukee, WI), se hizo una pequeña incisión en el abdomen

de cada ratón y se implantó un fragmento de tejido tumoral cerca de la próstata de cada ratón. Ocho días después de la operación, se inició la inyección de fármacos. Los fármacos se inyectaron de manera intravenosa cada día. El tamaño de los tumores subcutáneos se calculó según el método de Bissery et al. (42).

Implantación de células de cáncer ovárico OC24

5 Las células OC24 que crecían de manera subconfluente se transfirieron al medio de cultivo de tejidos sin suero bovino fetal ni antibióticos. La concentración de células se ajustó mediante el mismo medio. La disolución de células que contenía 5×10^4 células se inyectó en la cavidad peritoneal de cada ratón atímico en el día 0. El tratamiento con fármacos se inició a partir del día 3. Para el cálculo del efecto del tratamiento con fármacos, se midió el volumen de los líquidos ascíticos y de los tumores abdominales.

10 Ensayo de apoptosis

Se llevó a cabo un ensayo TUNEL simple mediante el uso de un equipo de detección de apoptosis mediante TUNEL (Upstate, Temecula, CA) con ciertas modificaciones. Las células se cultivaron en placas de cultivo de 12 micropocillos (Corning Inc., Corning, NY). Después del tratamiento, las células que flotaban en el medio de cultivo de tejidos y las células unidas al fondo de las placas de micropocillos se recogieron juntas en tubos de plástico. Después de centrifugar las células, se fijaron con un 10% de formaldehído en PBS (-) durante 5 minutos y se almacenaron en PBS (-). Las muestras de células fijadas se colocaron en portaobjetos de vidrio y se secaron al aire. Los portaobjetos de vidrio con las células fijadas se incubaron primero en una disolución que contenía un 0,05% de Tween-20, 0,2% de BSA en PBS (-) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se trataron después con desoxittransferasa terminal y biotina-dUTP incluidas en el equipo de ensayo TUNEL durante 60 minutos a temperatura ambiente, según el protocolo de la empresa. Tras la incubación, las muestras se incubaron con complejo avidina-biotina (reactivo ABC, Vector Laboratory Inc.) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras el lavado exhaustivo con PBS (-), los extremos del ADN de las muestras se expusieron mediante la reacción de peroxidasa con el uso de DAB como sustrato (equipo de sustrato de Peroxidasa (DAB), Vector Laboratory Inc., Burlington, CA). Las muestras se contratiñeron con verde de metilo y se incrustaron en VectaMount (Vector Laboratory Inc.).

Ensayo enzimático de caspasa-7

El ensayo enzimático específico de caspasa-7 se llevó a cabo mediante el uso de un equipo de inmunoensayo de caspasa-7 CaspSELECT (BioVision, Mountain View, CA). Este ensayo se basa en el ensayo colorimétrico con DEVD-afc. Debido a que DEVD-afc puede ser un sustrato para la caspasa-3 ó 7, se selecciona solamente la caspasa-7 a partir de extractos celulares mediante un anticuerpo anti-caspasa-7 que está revestido en placas de microtitulación. Brevemente, las placas de microtitulación se revistieron con anticuerpo anti-caspasa-7 durante la noche a 4 °C y se bloquearon con una disolución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los extractos celulares se aplicaron a las placas de microtitulación. Después de lavar las placas de microtitulación, se añadió el sustrato DEVD-afc a las placas y se incubaron durante alrededor de tres horas. La fluorescencia se midió mediante un lector de fluorescencia para placas de microtitulación Infinite 200 (Tecan, Suiza).

Inmunocitoquímica

Se cultivaron las células sobre cubreobjetos de vidrio revestidos con poli-L-ornitina (Sigma, Saint Louis, MO). A las 5 hrs tras el tratamiento con fármacos, las células se fijaron con un 10% de formaldehído diluido en PBS (-) y se lavaron con PBS (-) tres veces. Después de permeabilizarlas mediante un 0,2% de Tryton X-100 y un 1% de suero de cabra diluidos en PBS (-), las células se bloquearon mediante PBS (-) que contenía un 5% de suero de cabra. Las células se incubaron después con anticuerpos primarios diluidos en PBS (-) que contenían un 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA), y con anticuerpos secundarios, que fue anti-IgG conjugado con fluoresceína (Vector Laboratories, Burlingame, CA), diluido en PBS (-) que contenía un 0,5% de BSA. Las muestras se incrustaron en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) que contenía DAPI para la contratiñencia nuclear. Las células se observaron por medio de un microscopio confocal láser B29/Zeiss LSM 510 META (con un láser de 405 nm) (Carl Zeiss, Alemania).

Histología

Se extirparon los pulmones de los ratones que albergaban tumores y se fijaron en un 10% de formalina diluida en PBS (-). Los tejidos se cortaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina según la metodología estándar de Paragon (Baltimore, MD). Las muestras se observaron por medio de un microscopio Zeiss Axioplan con un objetivo Plan-Neofluar 2,5x (Carl Zeiss, Alemania). La adquisición de datos se realizó con el programa informático Slidebook 4.2.

Transferencia de Western

Después de haber cultivado las células en matraces de 25 mm² y de haberlas tratado con los reactivos, las células se lavaron con PBS (-) tres veces y se suspendieron en tampón RIPA (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), 0,1% de SDS, 1% de NP40, y 0,5% de desoxicolato) complementado con mezcla de inhibidores de proteasas (Calbiochem, San Diego, CA). Los volúmenes de las muestras se ajustaron por la cantidad de proteína total. El

ensayo de proteínas se llevó a cabo mediante el Ensayo de Proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA). Las muestras se resolvieron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida estándar y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Bjorkgatan, Suecia). Las membranas se bloquearon con leche descremada, y se incubaron con anticuerpos primarios a 4 °C durante la noche y después con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano a temperatura ambiente durante 2 hrs. Las señales se detectaron mediante el Reactivo de Quimioluminiscencia para Transferencia de Western Plus (New England Nuclear Life Science Products, Boston, MA).

Transferencia de Northern

Se extrajo el ARN de las células mediante un Reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se disolvieron veinticinco µg de ARN por carril en el gel de agarosa del 1,5% que contenía NaPO₄ 20 mM (pH 6,8) y un 6% de formaldehído. El ARN se transfirió a una membrana Nytran SPC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La sonda para BNIP3 derivó de un fragmento de ADN de 199 pb generado mediante RT-PCR con el uso de un sistema de síntesis de la primera cadena SuperScript III para RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), cebador de 5' "gctcctggtagaactgcac" y cebador de 3' "gtttcagaagccctgttgg". El fragmento de PCR se clonó en un vector Topo (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de una técnica Midi-Prep, el fragmento de ADN se extrajo del vector y se disolvió en el gel de agarosa del 2% y se purificó. El fragmento de ADN extraído se marcó con ³²P-αATP, fragmento Klenow, y cebadores hexaméricos aleatorios. Después de eliminar el ³²P-αATP sin incorporar mediante una columna de centrifugación de Sephadex G-50, se usó el fragmento de ADN marcado como sonda. Tras la hibridación, se lavó la membrana y se autorradiografió en una película BioMax MR (Kodak, Rochester, NY).

La medida del potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Las células se cultivaron en placas de 6 micropocillos y se trataron con el medio de cultivo que contenía colorante JC-1 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) durante 30 min, según el protocolo de la empresa. Después de haber lavado con cuidado las células, se trataron con M₄N durante 5 hrs. Las células se observaron por medio de un microscopio confocal láser B29/Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Alemania). Las imágenes de las células se capturaron mediante dos luces de excitación diferentes (con láseres de iones de argón de 488 nm y de argón-kriptón de 568 nm). El monómero de JC-1 y los agregados J se detectan mediante luz de excitación de 488 nm, mientras solamente se detectan agregados J mediante luz de excitación de 568 nm. Se calculó la proporción de la intensidad de la luz de emisión excitada mediante luz de 568 nm respecto de la de la luz de emisión excitada mediante luz de 488 nm en cada píxel de las imágenes (la proporción debería indicar el potencial mitocondrial) mediante el programa informático de formación de imágenes (Carl Zeiss, Alemania). En la figura, la proporción se mostró mediante un falso color. El color rojo indica una proporción elevada (potencial elevado) mientras el azul oscuro indica una proporción baja (potencial bajo). De amarillo pasando por verde hasta azul claro representa una proporción media (potencial medio).

En los ejemplos siguientes, solamente las combinaciones de M₄N y UCN-01 para el tratamiento de cáncer de mama, próstata, colon, hepático u ovárico o glioblastoma están de acuerdo con la invención.

Ejemplo 1: Inducción sinérgica de la muerte celular mediante el tratamiento de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, y UCN-01 en células de cáncer de próstata humano LNCaP. Se examinó la eficacia del tratamiento de combinación de M₄N con tres fármacos antineoplásicos, etopósido, rapamicina, y UCN-01 para inducir la muerte celular en células de cáncer de próstata humano LNCaP con el ensayo TUNEL. Se eligieron estos fármacos antineoplásicos tratando de diversificar los mecanismos con los que funcionan los fármacos antineoplásicos (43-45). Se demostró que M₄N induce la muerte celular TUNEL-positiva de manera sinérgica con todos estos fármacos antineoplásicos (Figura 1A). La representación de Chou-Talalay (40) confirmó que los tratamientos de combinación funcionaron de manera sinérgica para los tres fármacos a todas las concentraciones de fármacos a las que se examinó el efecto de los fármacos (Figura 1B). Los valores de IC indicaron que los tratamientos de combinación de M₄N/etopósido y M₄N/rapamicina fueron intensamente sinérgicos, mientras el tratamiento de combinación de M₄N/UCN-01 fue muy intensamente sinérgico (Figura 1B). Para observar la implicación de las caspasas en la muerte celular inducida mediante el tratamiento de combinación, se examinó la expresión de los productos escindidos (que son formas activas) de caspasa-3, 7, y 9, e ICAD (Figura 1C). Se detectó una gran expresión de la caspasa-3 y 9 escindidas solamente en las células tratadas con UCN-01 solamente. M₄N, etopósido, y rapamicina no indujeron la escisión en la caspasa-3 y 9. Sorprendentemente, el tratamiento de combinación de M₄N con UCN-01 tampoco indujo escisiones de caspasa-3 y 9, lo que indica que M₄N interfiere en la capacidad de UCN-01 de inducir la activación de caspasa-3 y 9. Al contrario, se detectaron los productos de escisión de la caspasa-7 (20 y 34 kDa) en las células tratadas en muchas condiciones diferentes (Figura 1C). El tratamiento con UCN-01 solo indujo la escisión de caspasa-7 en gran cantidad. A diferencia de la caspasa-3 y 9, M₄N no interfirió en la capacidad de UCN-01 de inducir la escisión de caspasa-7. Además, el tratamiento de combinación de M₄N y etopósido indujo mucha más escisión de caspasa-7 que el tratamiento con M₄N solo o el tratamiento con etopósido solo. El tratamiento con M₄N solo y el tratamiento de combinación de M₄N con rapamicina indujo una pequeña cantidad de escisión de caspasa-7, mientras el tratamiento con rapamicina sola no pudo inducir la escisión de caspasa-7 en absoluto. No se detectaron productos de escisión de ICAD en ningún caso. Para confirmar la activación de caspasa-7 detectada mediante la transferencia de Western, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico para caspasa-7 activa (Figura 1D). Los datos del ensayo colorimétrico confirmaron globalmente los datos de la transferencia de Western (Figura 1C). Brevemente, el

tratamiento con M₄N solo, tratamiento con etopósido solo, o tratamiento con rapamicina sola indujo solamente una pequeña cantidad de activación de caspasa-7. El tratamiento con UCN-01 solo indujo hasta cierto punto la activación de caspasa-7. El tratamiento de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, o UCN-01 indujo mucha más actividad de caspasa-7 que el tratamiento con etopósido, rapamicina, o UCN-01 solos, respectivamente. Además, se examinó el efecto del inhibidor de caspasa-3 y 7, zDEVD-fmk, sobre la muerte celular inducida por el tratamiento de combinación (Figura 1E). Debido a que el producto de escisión de caspasa-3 se observó solamente en las células tratadas con UCN-01 (Figura 1C), zDEVD-fmk, un inhibidor específico de caspasa-3 y 7, se considera que inhibe principalmente la activación de la caspasa-7 en las células tratadas de otra manera. Los datos del ensayo TUNEL demuestran que zDEVD-fmk inhibió una gran parte de la muerte celular inducida mediante los tratamientos de combinación (Figura 1E), lo que indica que caspasa-7 está implicada en este tipo de muerte celular. El hecho de que zDEVD-fmk no pudiera inhibir toda la muerte celular sugiere que existen otras maquinarias de muerte celular implicadas en la muerte celular, aparte del mecanismo asociado a la caspasa-7.

Ejemplo 2: Análisis de la autofagia en las células tratadas con el tratamiento de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, y UCN-01. Se ha dilucidado que la autofagia, así como la apoptosis/necrosis, desempeñan un papel muy importante en la actividad antineoplásica de los tratamientos con fármacos quimioterápicos. A continuación, se examinó el estado de la autofagia en las células tratadas con los tratamientos de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina o UCN-01. Se sabe que la expresión de LC3B-II tiene una buena correlación con la actividad de autofagia de las células (46). La mitad izquierda de la Figura 2A muestra que la expresión de LC3B-II (sin tratamiento con Baflomicina A₁), que refleja la actividad concurrente de autofagia, no se moduló mucho por cualquiera de los tratamientos de combinación a las 18 hrs tras el tratamiento. Sin embargo, estos datos simplemente muestran la actividad autofágica a las 18 hrs tras el tratamiento, ya que LC3B-II se sintetiza y desintegra muy rápido durante el proceso de autofagia. Para medir la actividad neta de autofagia tras el tratamiento con los fármacos, se añadió Baflomicina A₁, un inhibidor de la degradación del autofagosoma, al sistema experimental para prevenir la degradación de LC3B-II. Debido a que la degradación de LC3B-II se detiene en presencia de Baflomicina A₁, se estudiará el flujo neto de formación de LC3B-II que indica la actividad neta de autofagia desde el periodo que comienza con el tratamiento con fármacos y que finaliza con la recogida de las muestras. La mitad derecha de la Figura 3A muestra que la formación neta de LC3B-II (en otras palabras, la actividad autofágica neta) se inhibió casi totalmente mediante M₄N. La Figura 2B muestra las imágenes de autofagosomas que se revelan mediante la tinción inmunológica para LC3B en las células tratadas con los tratamientos de combinación en presencia de Baflomicina A₁. La tinción inmunológica muestra claramente que el tratamiento con M₄N redujo la cantidad neta de autofagosomas formados durante el periodo que comenzó con el tratamiento con fármacos y que finalizó con la recogida de las muestras (6 hrs después del tratamiento) muy drásticamente tanto en las células de control como en las células tratadas con cualquiera de los tratamientos de combinación. Todos los datos de la Figura 2 indican globalmente que M₄N tiene una actividad muy intensa de bloqueo de la autofagia.

Efecto Inhibitorio de M₄N sobre la Expresión de BNIP-3 y el Potencial de Despolarización de la Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). BNIP3 es un miembro de la familia de proteínas Bcl-2 que envía una señal pro-apoptótica a las mitocondrias e induce la despolarización del potencial de la membrana mitocondrial. Un informe reciente indicó que BNIP3 desempeña un papel importante en el mecanismo de inducción de la autofagia por estrés hipóxico que confiere a las células la capacidad de resistir las lesiones hipóxicas. Esto supone que BNIP3 está implicado en la autofagia y en la muerte celular. Para observar un posible papel de BNIP3 en la inducción sinérgica de la muerte celular mediante los tratamientos de combinación de M₄N con otros fármacos antineoplásicos y el efecto inhibitorio de M₄N sobre la autofagia, se examinó la expresión proteica (Figura 3A) y la expresión de mRNA (Figura 3B) de BNIP3. Debido a que se sabe que BNIP3 se activa más en condiciones hipóxicas (24), se examinó la expresión de BNIP3 en condiciones normóxicas e hipóxicas (Figuras 3A y B). Los datos de transferencia de Western muestran que M₄N bloquea la expresión proteica de BNIP3 en condiciones normóxicas o hipóxicas (Figura 3A). Previamente se demostró que la expresión de BNIP3 se aumenta por la hipoxia por medio de rutas dependientes e independientes del factor inducible por hipoxia (HIF)1 α (24). En este estudio, se aumentó la expresión de HIF1 α mediante la exposición de 6 hr de las células a la hipoxia (Figura 3A). M₄N no tuvo mucho efecto sobre la expresión de HIF1 α en este momento, aunque la expresión de BNIP3 ya estuvo significativamente reducida por el tratamiento con M₄N, lo que indica que la reducción de la expresión de BNIP3 mediante M₄N no estuvo provocada por el efecto indirecto de M₄N sobre HIF1 α y después BNIP3, sino que estuvo provocada probablemente por el efecto directo de M₄N sobre el gen de BNIP3 propiamente dicho. De hecho, los datos de la transferencia de Northern mostraron claramente que M₄N inhibió el incremento de la expresión del mRNA de BNIP3 facilitada por la exposición de 6 hr a las condiciones hipóxicas (Figura 3B). De manera interesante, M₄N redujo la expresión de HIF1 α inducida mediante la exposición de 18 hr de las células a la hipoxia. La expresión de beclina-1 no se vio afectada por ningún procedimiento (Figura 3A), lo que es coherente con los hallazgos de otro laboratorio, lo que indica que la expresión constitutiva de Beclina-1 es importante en la autofagia (24). La expresión de BNIP3L, un homólogo de BNIP3, solamente se redujo ligeramente mediante el tratamiento con M₄N (Figura 3A), lo que indica que M₄N moduló de manera específica la expresión de BNIP3.

Debido a que BNIP3 funciona para activar la maquinaria de muerte celular asociada a las mitocondrias e inducir la despolarización de la membrana mitocondrial, se examinó el efecto de M₄N sobre el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (Figura 3C). Los datos de imágenes de fluorescencia mediante el uso del colorante JC-1

muestran que el tratamiento con M₄N hiperpolarizó el potencial de la membrana mitocondrial, lo que es coherente con la suposición de que la reducción de la expresión de BNIP3 mediante el tratamiento con M₄N bloquea las señales de despolarización de la membrana mitocondrial derivadas de BNIP3. Los datos también son coherentes con el bloqueo mediado por M₄N de la activación por caspasa-9 y 3 inducido mediante el tratamiento con UCN-01 (Figura 1C), ya que la activación de caspasa-9 y después caspasa-3 está bien establecida como la consecuencia directa de la activación de la maquinaria de muerte celular asociada a las mitocondrias (15).

Ejemplo 3: Efecto de los tratamientos de combinación de M₄N con etopósido, rapamicina, y UCN-01 sobre la muerte celular y la autofagia en células humanas de cáncer de mama MCF-7 y de cáncer hepático HepG2. Se examinó el efecto de los tratamientos de combinación sobre la muerte celular y la autofagia en dos líneas celulares distintas de las células LNCaP. Las Figuras 4A y B muestran que se detectó una inducción sinérgica de la muerte celular en células MCF-7 de cáncer de mama humano, al igual que en células LNCaP. No se detectaron productos de escisión de caspasa-3 y 9 en las células MCF-7 tratadas con ningún fármaco de combinación examinado aquí, lo que indica que la ruta de muerte celular asociada a las mitocondrias no es funcional en esta línea celular (Figura 4C), aunque se detectó una cantidad sustancial de muerte celular mediante los tratamientos farmacológicos de combinación en esta línea celular, tanto como en las células LNCaP (Figura 4A). Al contrario, la escisión de caspasa-7 se detectó en células MCF-7 tratadas con tratamiento de UCN-01 solo, los tratamientos de combinación de M₄N con etopósido o UCN-01 (Figura 4C). De forma similar, ningún tratamiento indujo una cantidad sustancial de escisión de caspasa-3 ó 9 en células HepG2 de cáncer hepático humano (Figura 4C), lo que indica que la ruta de muerte celular mitocondrial está alterada en las células MCF-7 y HepG2, tal como se observa en muchas células cancerosas. De manera interesante, se detectó una pequeña cantidad de producto escindido de caspasa-3 en las células HepG2 tratadas con UCN-01 solo, mientras no se detectó escisión de caspasa-3 en las células tratadas con el tratamiento de combinación de M₄N con UCN-01 (Figura 4C). Esto es una reminiscencia de la escisión de caspasa-3 en las células LNCaP tratadas con UCN-01 solo o con el tratamiento de combinación de M₄N con UCN-01 (Figura 1C). Al contrario, se detectó mucho producto de escisión de caspasa-7 en las células HepG2 tratadas con UCN-01 o con el tratamiento de combinación de M₄N con UCN-01, a la vez que se detectó una cantidad pequeña de producto de escisión de caspasa-7 en las células tratadas con etopósido o rapamicina independientemente de un tratamiento concomitante con M₄N (Figura 4C). Globalmente, los datos del ensayo TUNEL indican que el tratamiento de combinación es capaz de inducir de manera sinérgica la muerte celular en las células cancerosas cuya maquinaria de muerte celular mitocondrial está alterada, tales como las células MCF-7 (Figuras 4A y B). Mientras tanto, los datos de la transferencia de Western muestran que la escisión de caspasa-7 está incrementada o inalterada en las células tratadas con los tratamientos de combinación en estas líneas celulares, así como en las células LNCaP (Figura 4C).

Se examinó el efecto de M₄N sobre la autofagia mediante el uso de la transferencia de Western para LC3B-II en presencia de Baflomicina A₁ en células MCF-7 y HepG2 (Figura 4D). Los datos de la transferencia de Western muestran que M₄N bloquea la autofagia en estas líneas celulares así como en las células LNCaP, lo que indica que el efecto supresor de M₄N sobre la autofagia es ubicuo hasta cierto punto en las células cancerosas.

Efecto de los tratamientos de combinación de M₄N con etopósido y rapamicina sobre la duración de la vida y la metástasis pulmonar en ratones atímicos (nu/nu) con implantes ortotópicos de tumores LNCaP. Los datos de los cultivos de tejidos con células LNCaP (Figuras 1A y B) que muestran la inducción sinérgica de la muerte celular mediante el tratamiento de combinación de M₄N/etopósido o de M₄N/rapamicina incitaron a examinar la eficacia antineoplásica de este régimen farmacológico de combinación en experimentos en animales con xenoinjertos. Se administraron los compuestos a ratones de manera intravenosa mediante el uso del sistema de disolventes CPE (25/30) (39). Los datos de la tasa de supervivencia tras la inoculación de los tumores (Figura 5A) muestran que todos los ratones que albergaban el tumor LNCaP tratados con M₄N y etopósido (9 de 9 ratones) o rapamicina (5 de 5 ratones) sobrevivieron más 100 días tras la implantación, mientras todos los ratones tratados con un único fármaco (etopósido, rapamicina, o M₄N) no sobrevivieron más de 34 días tras la implantación (todos los ratones de control murieron antes de 20 días tras la implantación). Los datos histológicos (Figura 5B) muestran que los pulmones de todos los ratones tratados con M₄N con etopósido o rapamicina no desarrollaron ninguna metástasis pulmonar evidente (etopósido: 0 de 5 ratones, rapamicina: 0 de 3 ratones), mientras muchos de los pulmones de los ratones tratados con un único fármaco (etopósido, rapamicina, o M₄N) desarrollaron metástasis pulmonar evidente (etopósido: 3 de 5 ratones, rapamicina: 3 de 4 ratones, M₄N: 2 de 4 ratones).

Ejemplo 4: Muerte celular inducida mediante el tratamiento de combinación de M₄N con UCN-01 en diversas células en cultivo de tejidos. Hasta ahora se ha examinado la inducción sinérgica de la muerte celular basada en M₄N con otros fármacos antineoplásicos, principalmente mediante el uso de la línea celular LNCaP de cáncer de próstata humano en este estudio distinto de los datos con células MCF-7 y HepG2 de la Figura 4. Todos estos datos muestran que el tratamiento de combinación de M₄N con UCN-01 indujo más muerte celular en todas las líneas celulares usadas hasta ahora, lo que incitó a examinar adicionalmente la eficacia del tratamiento farmacológico de combinación de M₄N con UCN-01. En primer lugar, se examinó la muerte celular en diversas líneas celulares tratadas con el tratamiento de combinación de M₄N con UCN-01. Los datos del ensayo TUNEL (Figura 6) muestran que M₄N induce de manera sinérgica la muerte celular con UCN-01 en nueve de doce líneas de células cancerosas que se examinaron, que incluyeron células de glioblastoma LN229, células de cáncer de colon HT29, tres células de cáncer de próstata diferentes (LNCaP, DU145, y PC3), tres células de cáncer de mama diferentes (MCF-7, MDA-

MB231, y MDA-MB468), y células de cáncer hepático HepG2. En las tres líneas celulares restantes (células de leucemia K562, células de cáncer ovárico OC24, y células de cáncer hepático Hep3B), M₄N indujo la muerte celular con UCN-01 al menos de manera aditiva o de manera débilmente sinérgica. En cada caso, el tratamiento farmacológico combinado de M₄N con UCN-01 mejoró la actividad de inducción de la muerte de células tumorales respecto del tratamiento con fármacos individuales de M₄N o UCN-01 solos.

Ejemplo 5: Efecto del tratamiento de combinación de M₄N con UCN-01 sobre la tasa de supervivencia de ratones que albergaban cáncer ovárico OC24. Los datos de los cultivos de tejidos (Figura 6) indicaron que el tratamiento de combinación de M₄N con UCN-01 tuvo la capacidad de mejorar la eficacia antineoplásica de M₄N en una amplia diversidad de cánceres. A continuación, se examinó si este tratamiento de combinación podría mejorar la eficacia antineoplásica de M₄N en experimentos con animales. En este experimento, se usaron ratones atímicos que albergaban cáncer ovárico OC24 como sistema modelo. Las células OC24 son cánceres muy agresivos, y tienen la capacidad de matar prácticamente a todos los ratones cuando se inoculan solamente diez mil células cancerosas de manera intraperitoneal a un ratón. Debido a que los datos de los cultivos de tejidos (Figura 1) mostraron que el tratamiento de combinación de M₄N/UCN-01 mejoró solamente de manera aditiva la eficacia de la inducción de la muerte celular respecto del tratamiento individual con M₄N o UCN-01 en esta línea celular, este experimento en animales debería revelar la capacidad de este tratamiento de combinación de mejorar la eficacia antineoplásica en las condiciones menos óptimas. Los datos de la tasa de supervivencia de ratones que albergaban cáncer ovárico OC24 con o sin tratamiento con fármacos se muestran en la Figura 7. Todos los ratones sin tratamiento murieron en menos de 26 días tras la inoculación de los tumores. Mientras tanto, cierto porcentaje de los ratones sobrevivieron en todos los grupos de tratamiento (M₄N solo, UCN-01 solo, o combinación M₄N/UCN-01) más de 45 días tras el tratamiento (el momento de preparación del presente manuscrito). La tasa de supervivencia a los 45 días tras el tratamiento fue del 33%, 20%, y 42% para el grupo de M₄N solo, UCN-01 solo, o combinación M₄N/UCN-01, respectivamente. Los datos indicaron que M₄N y UCN-01 mejoraron de manera aditiva la eficacia antineoplásica de cada fármaco en este modelo animal, tal como se esperaba a partir del experimento de cultivo de tejidos (Figura 6).

Efecto del tratamiento de combinación de M₄N con UCN-01 sobre el peso del líquido ascítico y de los tumores abdominales en ratones que albergaban cáncer ovárico OC24. Los datos de la tasa de supervivencia (Figura 7) indican que el tratamiento de combinación de M₄N/UCN-01 tuvo cierto efecto beneficioso para mejorar la eficacia antineoplásica de M₄N o UCN-01 para prolongar la duración de la vida de los ratones que albergaban tumores. Para estudiar adicionalmente la eficacia antineoplásica del tratamiento de combinación M₄N/UCN-01, a continuación se midió el volumen del líquido ascítico y de los tumores abdominales. El líquido ascítico se recogió de la cavidad peritoneal en el momento de la muerte de los ratones que albergaban tumores. Los tumores abdominales se localizan normalmente cerca del área en la que se inocularon los tumores mediante aguja. La Figura 8A muestra fotografías de tumores abdominales típicos como ejemplo. La Tabla 1 muestra el peso del líquido ascítico y el peso de los tumores en el momento de la muerte de los ratones. Los datos se recopilaron a los 45 días tras la inoculación de los tumores. Por lo tanto, todavía hubo varios ratones que sobrevivían a la masa tumoral. Los datos mostraron una tendencia global a que el peso de los tumores abdominales fuera más pequeño en los ratones tratados con el tratamiento de combinación de M₄N/UCN-01 que en los ratones de control o en los ratones tratados con M₄N o UCN-01 solos.

Tabla I. Efecto del tratamiento de combinación de M₄N/UCN-01 sobre el peso del líquido ascítico y los tumores abdominales en ratones que albergaban el tumor OC24 en el momento de la muerte. El líquido ascítico y los tumores abdominales se recogieron en el momento de la muerte de cada ratón. Debido a que los datos se obtuvieron a los 45 días tras la inoculación de los tumores, algunos ratones todavía estaban vivos, y no estaban disponibles para la medida del peso.

Tabla I. Efecto del tratamiento de combinación de M₄N/UCN-01 sobre el peso del líquido ascítico y los tumores abdominales en ratones que albergaban el tumor OC24 en el momento de la muerte.

Fármaco	Peso del Líquido Ascítico (g)	Peso de los Tumores (mg)
Control		
n° 1	N/A	N/A
n° 2	6,3	400
n° 3	9,3	561
n° 4	7,1	100
n° 5	6,7	34
n° 6	4,8	-

n° 7	11,2	-
M ₄ N		
n° 1	4,4	101,3
n° 2	Vivo	-
n° 3	7,8	<100
n° 4	Vivo	-
n° 5	5,8	360,5
n° 6	16,1	69
UCN-01		
n° 1	7,4	Sin Tumor
n° 2	15	360,5
n° 3	Vivo	-
n° 4	14,3	Sin Tumor
n° 5	2,9	87
M ₄ N + UCN-01		
n° 1	7,9	Sin Tumor
n° 2	4,8	76 mg
n° 3	Vivo	-
n° 4	14,9	47,3
n° 5	Vivo	-
n° 6	Vivo	-
n° 7	11,2	Sin Tumor

El líquido ascítico y los tumores abdominales se recogieron en el momento de la muerte de cada ratón. Debido a que los datos se obtuvieron a los 45 días tras la inoculación de los tumores, algunos ratones todavía estaban vivos, y no estaban disponibles para la medida del peso.

Una vez que el líquido ascítico comienza a acumularse en la cavidad peritoneal, a veces constituye una porción significativa del peso corporal. La Tabla II muestra el cambio de peso corporal de cada ratón a lo largo del tiempo tras la inoculación de los tumores.

- 5 Tabla II. Cambio del peso corporal en ratones que albergaban tumores OC24 tratados con la combinación de fármacos M₄N/UCN-01. El peso corporal se midió periódicamente para los ratones tratados con el vehículo solo, M₄N solo, UCN-01 solo, o la combinación M₄N/UCN-01. Las condiciones exactas de los protocolos de inyección de fármacos se describen en la leyenda de la Figura 2. El ratón n° 6 del grupo de UCN-01 murió accidentalmente. Por lo tanto, este ratón se omite para el análisis de los datos de la Figura 2-4, y la Tabla I. El peso corporal se representa en la escala de gramos.
- 10

TABLA II. Cambio del peso corporal en ratones que albergaban tumores OC24 tratados con la combinación de fármacos M4N/UCN-01.

Fecha	10 dic.	12 dic.	13 dic.	18 dic.	22 dic.	28 dic.	1 ene.	4 ene.	5 ene.	7 ene.	8 ene.	11 ene.	12 ene.	13 ene.	14 ene.	15 ene.	16 ene.	17 ene.	18 ene.	19 ene.	20 ene.	21 ene.	22 ene.	23 ene.	
Día nº	0	2	3	8	12	18	22	25	26	28	29	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	
Inyección		← Diariamente →																							
Control																									
nº 1	23,9			22,6	23,6	30,3		29,6 (31 de dic.)																	
nº 2	22			20,1	19,9	26,3	26,7																		
nº 3	21,6			20,6	21,2	23,3		30			30,9														
nº 4	21,6			21,1	21,6	24,2		29,7 (2 ene.)																	
nº 5	23,5			23,4	23,6	25,4		33																	
nº 6	22,1			20,7	21,7	22,6		28,8																	
nº 7	22,7			21,8	20,4	24				Muerto															
M4N																									
nº 2	24,1			22,3	22,8		23,9		23,2		24,1		26,2	25,5	25,3	24,8	25,7	25,8	26,3	26,4	26,4	26,4	26,4	26,4	25,3
nº 4	22,9			20,8	21,2		21,9		21,5		22,5		22,7	22,5	23,1	22,9	22	22,4	22,6	22,9	22,7	22,9	23,1	23,2	
nº 1	23,5			22,9	23,4		27,7		28		28,1	27,9													
nº 3	22,3			21,5	20,9		30,1	29,8 (Sacrificado el 1 de ene.)																	
nº 5	20			19,1	20,2			25,8 (31 dic.)																	
nº 6	21,4			20,9	20,5		27,7		38,8	37,5															
UCN-01																									
nº 3	22,8				23,4		24,4		24,8		25,5		27,9	27,6	27,4	27,5	26,5	27,2	27,3	27,1	27,4	27,4	27,8	26,7	
nº 1	22,1				21,8		30,7		29,5																
nº 2	23,4				22,6		35,7		39,5		38,4 (6 de ene.)														
nº 4	21,6				22,6		30,5		35,9																
nº 5	19,6				18,3		22,9		26,2		27,3	22,5													
nº 6	20,6				20,8				21,9																
M4N + UCN-01																									
nº 3	20,9				19,1	19,2	20,9		20,3		21	22,5	23,1	23,4	23,5	23,4	19	17,4	21,9	22,1	22,7	22,9	22,8	22,7	
nº 5	23,7				23,6		30,5		25,7		25,5	27,7	27,2	28,4	27,6	28,2	26,6	28,1	28,1	27,9	28	28,6	28,5	27,7	
nº 6	21,9				20,3		26		23,4		23	24	24,8	24,3	24,2	23,8	22,3	23,6	23,8	23,4	24	24,8	24,9	25	
nº 1	22,8				20,3		30,7		31,8																
nº 2	23,8				21,2		28,6		27,5																
nº 4	20,8				21		24,9		32,5		35,7														
nº 7	21,2				21,8		22,7		32,4																

El peso corporal se midió periódicamente para los ratones tratados con el vehículo solo, M4N solo, UCN-01 solo, o la combinación M4N/UCN-01. Las condiciones exactas de los protocolos de inyección de fármacos se describen en la leyenda de la Figura 2. El ratón nº 6 del grupo de UCN-01 murió accidentalmente. Por lo tanto, este ratón se omite para el análisis de los datos de la Figura 2-4, y la Tabla I. El peso corporal se representa en la escala de gramos.

El incremento del peso corporal de los ratones muertos en el momento de la muerte sobre el peso inicial fue del 37,8% (DE=18,9%, N=19), mientras el incremento del peso corporal de los ratones vivos a los 40 días tras la inoculación de los tumores sobre el peso inicial fue del 9,5% (DE=7,5%, N=6). La diferencia de los dos grupos es estadísticamente significativa mediante la prueba t (0,2%). Esto indicó que el peso corporal de los ratones (o líquido ascítico) se incrementó de manera muy significativa en el momento de su muerte. Por lo tanto, el cambio de peso corporal se puede usar como indicador para estimar el volumen de líquido ascítico y así el estado global de los ratones. La Tabla 2 muestra que el peso corporal del ratón nº 5 del grupo de tratamiento de combinación disminuyó desde 30,5 g (día 22) hasta 25,7 g (día 26). El peso corporal se incrementó ligeramente tras el día 26. Sin embargo, no ha alcanzado el peso máximo alcanzado en el día 22 (30,5 g). La Figura 8B muestra las fotografías de este ratón desde el día 22 hasta el día 43. Las fotografías muestran la disminución evidente del volumen del área abdominal desde el día 22 hasta el día 29 pasando por el día 26. Esto indicó casi con toda certeza la reducción del líquido ascítico. Las fotografías también muestran que el tamaño del tumor subcutáneo en el centro izquierdo del área abdominal se ha reducido desde el día 22 hasta el día 43. Se midió la anchura abdominal indicativa del volumen de líquido ascítico, y el tamaño del tumor abdominal de este ratón en particular, y se representó respecto del tiempo tras la inoculación del tumor (Figura 8C), lo que demuestra claramente que el tamaño abdominal y el tamaño del tumor disminuyeron a lo largo del tiempo. Las observaciones representadas en las Figuras 8B y 8C indican que el tratamiento de combinación de M₄N con UCN-01 puede reducir la masa tumoral incluso después de que el tamaño del tumor haya alcanzado un cierto punto.

20 Discusión

La autofagia es un proceso celular crucial para mitigar las lesiones en las células sometidas a estrés (27, 28). La autofagia puede funcionar de dos maneras opuestas con respecto a la terapia del cáncer (27, 28). El estrés activa la autofagia, que mitiga las lesiones y estimula la senescencia, lo que limita la tumorigénesis. Por otra parte, la autofagia también permite a las células tumorales sobrevivir al estrés metabólico, pasar a ser inactivas, y regenerarse con el alivio del estrés, lo que puede estimular la tumorigénesis. La terapia citotóxica, selectiva, y con radiación amplifica el estrés y la autofagia, además del estrés metabólico inherente en el microambiente tumoral. Los inhibidores de la autofagia bloquean la autofagia, lo que amplifica la lesión y la muerte celular, a la vez que también reducen el reposo y la regeneración, inclinando el equilibrio a favor de la regresión tumoral. De manera alternativa, los estimuladores de la autofagia pueden ser útiles para la prevención del cáncer aumentando la mitigación de las lesiones y la senescencia.

Sin embargo, en conjunto, la bibliografía reciente indicó que la inhibición de la autofagia es beneficiosa en la práctica para mejorar los efectos de los fármacos antineoplásicos. Amaravadi et al. demostró que la inhibición de la autofagia mediante hidroxiclороquina (HCQ), que bloquea la acidificación de los lisosomas y la degradación de los autofagosomas, mejoró la eficacia antineoplásica de los fármacos alquilantes (47). Ding et al. demostró que la inducción de la autofagia mediante productos químicos tales como A23187, tunicamicina, taspigargina, y brefeldina A mitigó el estrés en líneas celulares de cáncer de colon y las protegió de la muerte celular, mientras la autofagia inducida mediante los mismos productos químicos no confirió protección en una línea celular de colon normal, ni en los fibroblastos embrionarios sin transformar, y en su lugar contribuyó a la muerte celular (48). Estos hallazgos indicaron que la inhibición de la autofagia inducida mediante HCQ podría aumentar la muerte celular mediada por la terapia antineoplásica específicamente en las células cancerosas. Se han iniciado varios ensayos clínicos en pacientes con tumores sólidos y hematopoyéticos para poner a prueba esta teoría (27). La mayoría de estos ensayos son combinaciones de HCQ con quimioterapia citotóxica, inductores del estrés metabólico o terapias selectivas, con la hipótesis global de que la autofagia es un mecanismo de resistencia terapéutica, y HCQ incrementará la citotoxicidad mediante la inhibición de la autofagia.

En respuesta al estrés metabólico, la autofagia puede retrasar la muerte celular mediante apoptosis, y en las células deficientes de apoptosis, la inactivación de la ruta de supervivencia mediante autofagia estimula la muerte celular necrótica in vitro y en tumores in vivo (29, 31, 36). Se descubrió que M₄N bloquea la autofagia (esta observación se demostró mediante la reducción del flujo neto de la proteína LC3B-II con transferencia de Western e inmunocitoquímica). Aunque ya se ha establecido que HCQ es un inhibidor de la autofagia, el mecanismo para inhibir la autofagia parece ser diferente entre M₄N y HCQ. A diferencia de HCQ, el objetivo de M₄N parece ser la proteína BNIP3, que es un activador de la muerte celular y de la autofagia. Por ejemplo, se demostró que BNIP3 actúa como mediador en la autofagia inducida por el estrés hipóxico y protege a las células de las lesiones celulares mediadas por la hipoxia (24). Los tumores a menudo están expuestos a condiciones hipóxicas, debido a que los tumores de crecimiento rápido normalmente no reciben un suministro suficiente de vasos sanguíneos. Al mismo tiempo, la terapia citotóxica, selectiva, y de radiación amplifica el estrés. La prevención de la expresión de BNIP3 reducirá la capacidad de las células cancerosas de enfrentarse a este estrés asociado a menudo al desarrollo del tumor y la terapia del cáncer.

Aparte del efecto de estimular la autofagia, se sabe que BNIP3 induce la despolarización de la membrana mitocondrial y activa la ruta apoptótica citocromo c-caspasa-9-caspasa-3 (25, 26). La expresión reducida de BNIP3 debería dar como resultado la hiperpolarización de la membrana mitocondrial, que bloquea la activación de caspasa-9 y 3 inducida por otros fármacos antineoplásicos. En este sentido, la inhibición de BNIP3 mediante M₄N debería

bloquear la autofagia y la muerte celular mediada por mitocondrias convencional. De hecho, la activación de caspasa-9 y 3 inducida mediante el tratamiento con UCN-01 se interfirió mediante el tratamiento concomitante de UCN-01 con M₄N (Figura 1C). Se demostró que M₄N hiperpolariza el potencial de la membrana mitocondrial, lo que debería interferir en la función de los mecanismos de la muerte celular asociada a las mitocondrias. También se descubrió que la despolarización del potencial de la membrana mitocondrial inducida mediante el tratamiento con rottlerina o Ly294002 en células LNCaP se invirtió hasta el potencial normal hasta cierto punto mediante el tratamiento concomitante de estos productos químicos con M₄N (véase el anexo). Los datos indican en conjunto que la inhibición de BNIP3 inducida mediante M₄N bloquea el mecanismo de muerte celular asociada a las mitocondrias, al igual que inhibe la autofagia.

De manera interesante, existe una secuencia consenso de Sp1 en la región promotora de la proteína BNIP3 (49). Uno de los mecanismos para que M₄N lleve a cabo las diversas actividades fisiológicas es la inhibición reversible de la unión de la proteína Sp1 a las secuencias consenso de Sp1 del genoma (3). Es muy posible que M₄N inhiba la expresión de BNIP3 reduciendo la actividad del promotor del gen de BNIP3 por medio de la unión a la secuencia consenso de Sp1 del promotor. Recientemente se demostró que M₄N pudo reducir la inflamación por medio de su capacidad de unirse al sitio de la secuencia de unión consenso de NFκB (50). Se demostró que debido a que existe homología entre la secuencia consenso del sitio de unión de Sp1 y la del sitio de unión de NFκB, M₄N pudo unirse a ambos sitios de Sp1 y NFκB (50). Se han publicado varios artículos que indican que NFκB desempeña un papel importante en la regulación de la expresión de BNIP3 (51, 52). Estos hallazgos propusieron que M₄N podría interferir en la expresión de BNIP3 mediante la unión a la secuencia consenso de NFκB en vez de a la secuencia consenso de Sp1 en el promotor de BNIP3.

Independientemente del bloqueo de los mecanismos de muerte celular mitocondrial, el tratamiento de combinación de M₄N con otros fármacos antineoplásicos (y también con rottlerina o Ly294002, véase el anexo) mejoró definitivamente la eficacia antineoplásica de estos fármacos antineoplásicos. Este es el caso, ya que el tratamiento de combinación parece ser capaz de utilizar otros mecanismos de muerte celular distintos de los mecanismos convencionales de muerte celular asociada a las mitocondrias. La ruta de muerte celular asociada a caspasa-7 es una de las maquinarias de muerte celular que se pueden usar mediante los tratamientos de combinación, debido a que la activación de caspasa-7 no requiere la activación mitocondrial (53, 54). El estudio con la transferencia de Western, el ensayo colorimétrico, y los experimentos con el inhibidor zDEVD-fmk indican que la caspasa-7 es responsable hasta cierto punto de la muerte celular inducida mediante los tratamientos de combinación. Existe mucha bibliografía, lo que indica que la activación de caspasa-7 es responsable de la inducción de la muerte celular en células cancerosas también en ciertas condiciones experimentales (55, 56), lo que apoya el hallazgo de que la activación de caspasa-7 es capaz de inducir la muerte celular, lo que es suficiente para provocar una actividad antineoplásica eficaz. Debido a que zDEVD-fmk no puede inhibir completamente la muerte celular (Figura 1E), probablemente los mecanismos de muerte celular independientes de caspasa (tales como la necrosis) también participan en la muerte celular inducida mediante los tratamientos de combinación (57). El estudio que usó zVAD-fmk en el sistema experimental de células LNCaP tratadas con los tratamientos de combinación de M₄N con rottlerina y Ly294002 también apoya este concepto (véase el anexo). Previamente se demostró que la consecuencia de la inhibición de zVAD de la muerte celular (por medio de la inhibición de las caspasas) y de la supervivencia celular mediante autofagia (por medio de la inhibición de Cathepsina B) es la inducción de la muerte celular necrótica (58). Debido a que M₄N puede bloquear la muerte celular convencional asociada a las mitocondrias y la supervivencia celular autofágica, el tratamiento con M₄N debería ser capaz de inducir la necrosis si los hallazgos se aplicaran a los resultados.

Los fármacos antineoplásicos tienen efectos adversos sobre los tejidos normales, al igual que sobre las células cancerosas. En muchos casos, existen diferencias sustanciales en la fisiología mitocondrial entre las células normales y las células cancerosas. Para mantener un consumo elevado de energía debido a una velocidad elevada de crecimiento, las mitocondrias de las células cancerosas a menudo están en un estado de hiperpolarización de la membrana (13, 14). Los mecanismos de muerte celular mediada por las mitocondrias normalmente están bloqueados en las mitocondrias hiperpolarizadas. Esto hace que las células cancerosas sean resistentes a los estímulos de muerte celular. Por otra parte, las células normales son muy susceptibles a los estímulos de muerte celular, debido a que las mitocondrias normales comienzan fácilmente a experimentar la despolarización de la membrana en respuesta a esos estímulos. Normalmente se considera que las células LNCaP son menos agresivas que muchas otras células cancerosas, ya que las células LNCaP son positivas para p53 de tipo natural y positivas para receptores de andrógenos. Si esta suposición es correcta, se considera que la diferencia de la expresión de formas escindidas de caspasa-9 y -3 entre las células LNCaP (Figura 1C) y células tales como las células MCF-7 o HepG2 (Figura 4C) está relacionada hasta cierto punto con la diferencia de la fisiología de las mitocondrias entre las células normales y las células cancerosas. Así, los datos de la transferencia de Western que muestran la interferencia de la activación de caspasa-9 y -3 mediante M₄N (Figura 1C) se pueden aplicar a lo que ocurriría a los mecanismos de muerte celular asociada a las mitocondrias de los tejidos normales tratados con M₄N, que es que M₄N debería poder proteger a las células normales de los efectos tóxicos adversos de los fármacos antineoplásicos previniendo la muerte celular convencional asociada a las mitocondrias. Mientras tanto, M₄N todavía permite la muerte celular dependiente de caspasa-7 y otra muerte celular independiente de las mitocondrias. Así, el resultado global del tratamiento de combinación con M₄N debería ser que habrá más toxicidad hacia las células cancerosas con menos toxicidad hacia las células normales.

5 Las células cancerosas, que necesitan más energía que las células normales, son más vulnerables al estrés metabólico que las células normales. El bloqueo autofágico inducido por M₄N provoca más efectos perjudiciales a las células cancerosas que a las células normales, e incrementa la eficacia de los fármacos antineoplásicos en las células cancerosas, mientras la inhibición de BNIP3 inducida por M₄N protege a las células normales de los efectos tóxicos de los fármacos que resultan de la muerte celular dependiente de caspasa-9 y -3 que es más perjudicial para las células normales que para las células cancerosas (porque las células cancerosas a menudo tienen mitocondrias alteradas, mientras las células normales tienen mitocondrias completamente funcionales). Probablemente, esta es la razón principal por la que M₄N es bastante atóxico, lo que se ha demostrado de muchas maneras en ensayos clínicos de M₄N mediante el uso de pacientes humanos (10). Podría ser que los pacientes pudieran tolerar dosis más altas de fármacos antineoplásicos en los tratamientos de combinación con M₄N, debido a que es razonable predecir que M₄N reduzca los efectos tóxicos de otros fármacos antineoplásicos previniendo el mecanismo convencional de muerte celular.

15 Cuando el bloqueo autofágico y el bloqueo de BNIP3 funcionan juntos en presencia de fármacos antineoplásicos con una eficacia intensa para desestabilizar la integridad de los sistemas celulares, la consecuencia es que se induce de una manera más eficaz la muerte celular en las células cancerosas, mientras las células normales quedan bastante protegidas de los efectos citotóxicos intensos de los fármacos antineoplásicos. M₄N es muy excepcional, en el sentido de que un agente químico puede realizar estas dos acciones importantes esenciales para permitir que los fármacos antineoplásicos combinados funcionen de manera eficaz en situaciones clínicas. Además, el hallazgo de que M₄N inhibe la actividad de BNIP3 amplía el uso potencial de M₄N más allá del uso como fármaco antineoplásico. Se considera que BNIP3 es una causa importante de muerte de células cardíacas tras un infarto de miocardio (26).
 20 Debido a que M₄N puede aliviar la muerte celular dependiente de caspasa por medio de la activación de BNIP3, protegerá a las células cardíacas restantes de morir tras un infarto de miocardio. Este esquema puede funcionar en muchas otras situaciones en las que existe la necesidad de proteger a las células de morir en caso de emergencia.

Referencias

1. Hwu, J.R., W.N. Tseng, J. Gnabre, P. Giza, P. y R.C. Huang. 1998. Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 1. Synthesis, structure identification, and inhibition of tat-regulated HIV transactivation. *J. Med. Chem.* 41:2994-3000.
- 5 2. Chen, H., L. Teng, J.N. Li, R. Park, D.E. Mold, J. Gnabre, J.R. Hwu, W.N. Tseng, y R.C. Huang. 1998. Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 2. Targeting helps simplex virus replication by the mutation insensitive transcription inhibitor tetra-O-methyl-NDGA. *J. Med. Chem.* 41:3001-3007.
3. Heller, J.D., J. Kuo, T.C. Wu, W.M. Kast, y R.C. Huang. 2001. Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid induces G2 arrest in mammary cells and exhibits tumoricidal activity in vivo. *Cancer Res.* 61:5499-5504.
- 10 4. Chang, C.C., J.D. Heller, J. Kuo, y R.C. Huang. 2004. Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid induces growth arrest and cellular apoptosis by inhibiting Cdc2 and surviving expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:13239-13244.
- 5 15 5. Park, R., C.C. Chang, Y.C. Liang, Y. Chung, R.A. Henry, E. Lin, D.E. Mold, y R.C. Huang. 2005. Systemic treatment with tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid suppresses the growth of human xenograft tumors. *Clin. Cancer Res.* 11:4601-4609.
6. Wang, L., Wei, D., Huang, S., Peng, Z., Le, X., Wu, T.T., Yao, J., Adjani, J, y Xie, K. 2003. Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* 9: 6371-80.
7. Yao, J.C., Wang, L., Wei, D., Gong, W., Hassan, M, Wu, T.T., Mansfield, P., Ajani, J., y Xie, K. 2004. Association between expression of transcription factor Sp1 and increased vascular endothelial growth factor. *Clin. Cancer Res.* 10: 4109-17.
- 20 8. Los datos de un ensayo clínico: Study of Intralesional Injection of M4N in Patients with Refractory Malignant Tumors of the Head and Neck. Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT00057512, (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00057512?term=em1421&rank=6>).
9. N. Khanna, R. Dalby, M. Tan, S. Arnold, J. Stern, y N. Frazer. 2007. Phase I/II clinical safety studies of terameprocol vaginal ointment. *Gynecologic Oncology* 107: 554-562.
- 25 10. Los datos de un ensayo clínico: Tetra-O-methyl Nordihydroguaiaretic acid in treating patients with recurrent high-grade glioma. Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT00404248, (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00404248?term=M4N&rank=5>).
11. Omuro, A.M. 2008. Exploring multi-targeting strategies for the treatment of gliomas. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 9: 1287-95.
- 30 12. Baxevanis, C.N., Perez, S.A., y Papamichail, M. 2009. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 58: 317-24.
13. Michelakis, E.D., Sutendra, G., Dromparis, P., Webster, L., Haromy, A., Niven, E., Mguire, C., Gammer, T.-L., Mackey, J.R., Fulton, D, Abdulkarim, B., McMurtry, M.S., y Petrunck. K.C. Metabolic Modulation of Glioblastoma with Dichloroacetate. *Sci. Transl. Med.* 2: 31-4.
- 35 14. Mockenbery, D.M. 2010. Targeting mitochondria for cancer therapy. 51: 476-89.
15. Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., y Kroemer, G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 13: 1423-33.
16. Martinez-Caballero, S., Dejean, L.M., Jonas, E.A., y Kinnally, K.W. 2005. The role of the mitochondrial apoptosis induced channel MAC in cytochrome c release. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37: 155-64.
- 40 17. Tait, S.W. y Green, D.R. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11: 621-32.
18. Leber, B., Geng, F., Kale, J., y Andrews, D.W. 2010. Drugs targeting Bcl-2 family members as an emerging strategy in cancer. *Expert Rev. Mol. Med.* 12:e28.
- 45 19. Kang, M.H., y Reynolds, C.P. 2009. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 15: 1126-32.
20. Chonghale, T.N. y Letai, A. 2008. Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene. Supl.* 1:S149-57.
21. Garcia-Saez, A.J., Fuertes, G., Suckale, J., y Salgado, J. 2010. Permeabilization of the outer mitochondrial membrane by Bcl-2 proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 677: 91-105.

22. Burton, T.R., y S.B. Gibson. 2009. The role of Bcl-2 family member BNIP3 in cell death and disease: NIPping at the heels of cell death. *Cell Death Diff.* 16:515-23.
23. Zhang, F., y P.A. Ney. 2009. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Diff.* 16: 939-46
- 5 24. Zhang, H., M. Bosch-Marce, L.A. Shimoda, Y.S. Tan, J.H. Baek, J.B. Wesley, F.J. Gonzalez, y G.L. Semenza. 2008. Mitochondrial Autophagy Is an HIF-1-dependent Adaptive Metabolic Response to Hypoxia. *J. Biol. Chem.* 283:10892-903.
25. Kubli, D.A., Ycaz, J.E., y Gustafsson, A.B. 2007. Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. *Biochem. J.* 405: 407-15.
- 10 26. Quinsay, M.N., Lee, Y., Rikka, S. Sayen, M.R., Molkentin, J.D., Gottlieb, R.A., y Gustafsson, A.B. 2010. Bnip3 mediates permeabilization of mitochondria and release of cytochrome c via a novel mechanism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48: 1146-56.
27. White, E. y R.S. DiPaola. 2009. The Double-Edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. *Clin. Cancer Res.* 15: 5308-16.
- 15 28. Maiuri, M.C., E. Tasdemir, A. Criollo, E. Morselli, J.M. Vicencio, R. Carnuccio, y G. Kroemer. 2009. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Diff.* 16: 87-93.
29. Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gellnas, C., Fan Y., Nelson, D.A., Jin, S., y White, E. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10: 51-64.
- 20 30. Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., y Mizushima, N. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441: 885-9.
31. Karantza-Wadsworth, V., Patel, S., Kravchuk, O., Chen, G., Mathew, R., Jin, S., y White, E. 2007. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev.* 21: 1621-35.
- 25 32. Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., y Tanaka, K. 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441: 880-4.
33. Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E., y Tanaka, K. 2007. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131: 1149-1163.
- 30 34. Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., y Mizushima, N. 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432: 1032-6.
- 35 35. Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., y Thompson, C.B. 2005. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120: 237-48.
36. Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C.M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S., y White, E. 2007. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* 21: 1367-81.
37. Levine B, Kroemer G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132: 27-42.
38. Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., y White, E. 2007. Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7: 961-7.
- 40 39. Lopez, R.A., A.B. Goodman, M. Rhodes, J.A. Blomberg, y J. Heller. 2007. The anticancer activity of the transcription inhibitor terameprocol (meso-tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid) formulated for systemic administration. *Anti-Cancer Drugs* 18:933-939.
40. Chou, T.-C. y Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enz. Regul.* 22: 27-55, 1984.
- 45 41. Wang, X., Z. Zili, J. Geller, y R.M. Hoffman. 1999. High-malignancy orthotopic nude mouse model of human prostate cancer LNCaP. *The Prostate* 39:182-186.
42. Bissery, M.C., Guenard, D., Gueritte-Voegelein, F., y Lavelle, F. 1991. Experimental antitumor activity of Taxotere (RP 56976, NSC 628503), a Taxol analogue. *Cancer Res.* 51: 4845-52.
43. L1, T.K. y L.F. Liu. 2001. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Ann. Rev. Pharmacol.*

Toxicol. 41:53-77.

44. Huang, S., M.-A. Bjornsti, y P.J. Houghton. 2003. Rapamycins: Mechanism of Action and Cellular Resistance. *Cancer Biology & Therapy* 2:222-232.
- 5 45. Akinaga, S., K. Sugiyama, y T. Akiyama. 2000. UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) and other indolocarbazole compounds: a new generation of anti-cancer agents for the new century? *Anticancer Drug Des.* 15:43-52.
46. Rubinsztein, D.C., A.M. Cuervo, B. Ravikumar, S. Sarkar, V. Korolchuk, S. Kaushik, y D.J. Klionsky. 2009. In search of an "autophagometer" *Autophagy* 5: 585-589.
- 10 47. Amaravadi. R.K., D. Yu, J.J. Lum, T. Bui, M.A. Christophorou, G.I. Evan, A. Thomas-Tikhonenko, y C.B. Thompson. 2007. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J. Clin. Invest.* 117:326-336.
48. Ding, W.-X., H.-M. Ni, W. Gao, Y.-F. Hou, M.A. Melan, X. Chen, D.B. Stolz, Z.-M. Shao, y X.-M. Yin. 2007. Differential Effects of Endoplasmic Reticulum Stress-induced Autophagy on Cell Survival. *J. Biol. Chem.* 282: 4702-10.
- 15 49. Tracy, K., B.C. Dibling, B.T. Spike, J.R. Knabb, P. Schumacker, y K.F. Macleod. 2007. BNIP3 Is an RB/E2F Target Gene Required for Hypoxia-Induced Autophagy. *Mol. Cell. Biol.* 27: 6229-42.
50. Eads, D., R.L. Hansen, A.O. Oyegunwa, C.E. Cecil, C.A. Culver, F. Scholle, I.T.D. Petty, y S.M. Laster. 2009. Terameprocol, a methylated derivative of nordihydroguaiaretic acid, inhibits production of prostaglandins and several key inflammatory cytokines and chemokines. *J. Inflamm.* 6: 2-19.
- 20 51. Shaw, J.N. Yurkova, T. Zhang, H. Gang, F. Aguilar, D. Weidman, C. Scramstad, H. Weisman, y L.A. Kirshenbaum. 2008. Antagonism of E2F-1 regulated Bnip3 transcription by NF- κ B is essential for basal cell survival. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 105: 20734-9.
52. Shaw, J., T. Zhang, M. Rzezutek, N. Yurkova, D. Baetz, J.R. Davie, y L.A. Kirshenbaum. 2006. Transcriptional silencing of the death gene BNIP3 by cooperative action of NF- κ B and histone deacetylase 1 in ventricular myocytes. *Circ. Res.* 99: 1347-54.
- 25 53. Lamkanfi, M., Kanneganti, T.-D., Damme, P.V., Berghe, T.V., Vanoverberghe, I., Vandekerckhove, J., Vandenabeele, P., Gevaert, K. y Nuñez, G. 2008. Targeted peptidocentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of caspase-1 inflammasomes. *Mol. Cell. Proteomics* 7: 2350-63.
54. Gafni, J., Cong, X., Chen, S.F., Gibson, B.W., y Ellerby, L.M. 2009. Calpain-1 cleaves and activates caspase-7. *J. Biol. Chem.* 284: 25441-9.
- 30 55. Marcelli, M., R.G. Cunningham, S. Joe Haidacher, S.J. Padayatty, L. Sturgis, C. Kagan, y L. Denner. 1998. Caspase-7 is activated during lovastatin-induced apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res.* 58: 76-83.
56. Rokhlin, O.W., R.A. Glover, y M.B. Cohen. 1998. Fas-mediated apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines occurs via activation of caspase-8 and caspase-7. *Cancer Res.* 58: 5870-5.
- 35 57. Kroemer, G. y Martin S.J. 2005. Caspase-independent cell death. *Nature Med.* 11: 725-30.
58. Wu YT, Tan HL, Huang Q., Kim, Y.S., Pan, N., Ong, W.Y., Liu, Z.G., Ong, C.N. y Shen, H.M. 2008. Autophagy plays a protective role during zVAD-induced necrotic cell death. *Autophagy* 4: 457-66.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de ácido tetra-O-metil nordihidroguayarético (M₄N) o ácido maltosa-tri-O-metil nordihidroguayarético (maltosa-M₃N);
y una cantidad eficaz de 7-hidroxiestaurosporina.
- 5 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 para el uso como un medicamento para tratar el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer hepático, glioblastoma y/o cáncer ovárico en un mamífero.
3. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 2, en la que el mamífero es un ser humano, gato, perro o ratón.
- 10 4. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 2 ó 3, en la que el tumor es un tumor sólido o un tumor hematológico.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 para el uso como un medicamento para prevenir o inhibir el crecimiento tumoral en un animal con cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer hepático, glioblastoma y/o cáncer ovárico.
- 15 6. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 5, en la que el animal es un ser humano, gato, perro o ratón.
7. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 5 ó 6, en la que el tumor es un tumor sólido o un tumor hematológico.
- 20 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 para el uso como un medicamento para prevenir la metástasis tumoral en un mamífero con cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer hepático, glioblastoma y/o cáncer ovárico.
9. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 8, en la que el mamífero es un ser humano, gato, perro o ratón.
10. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 8 ó 9, en la que el tumor es un tumor sólido o un tumor hematológico.
- 25 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 en una cantidad eficaz para el uso en un medicamento.

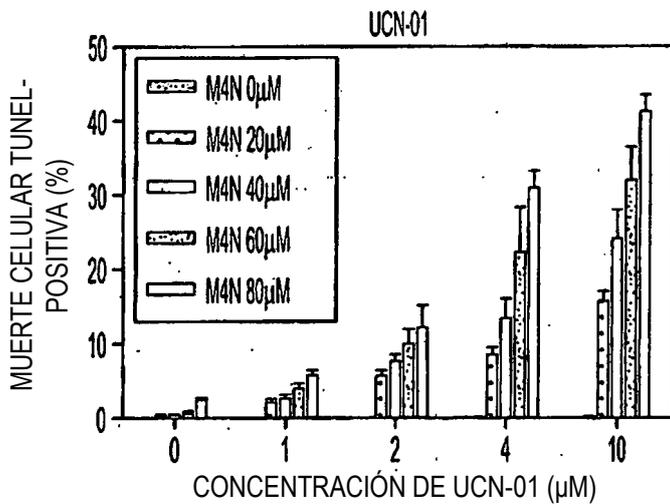
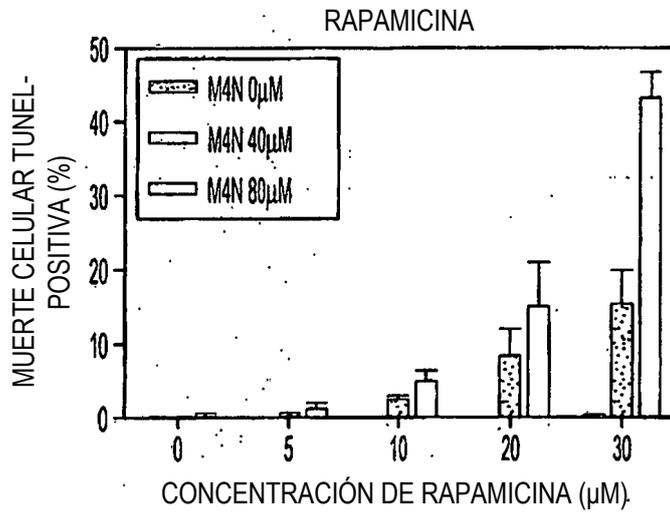
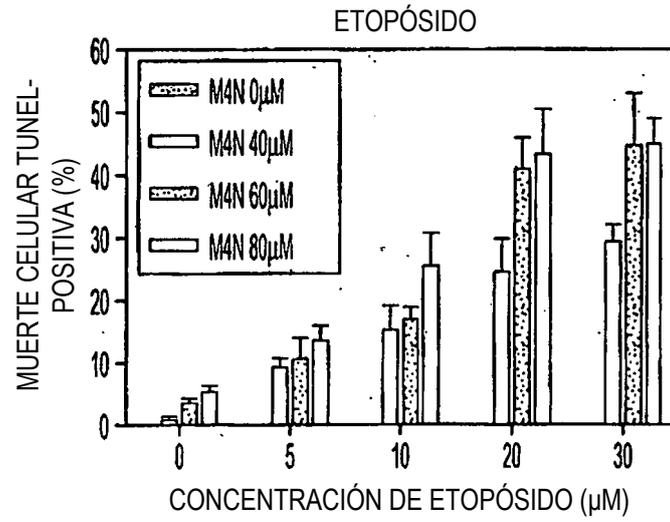


FIG. 1A

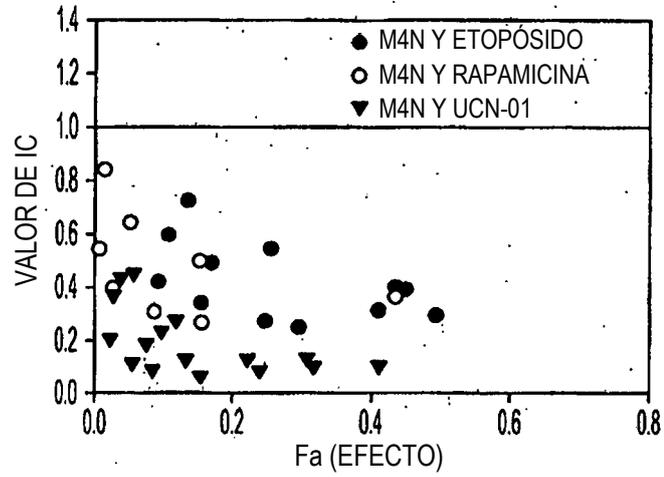


FIG. 1B

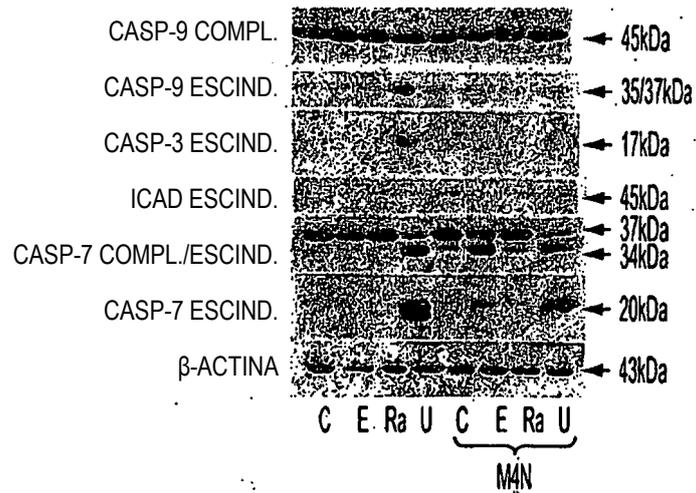


FIG. 1C

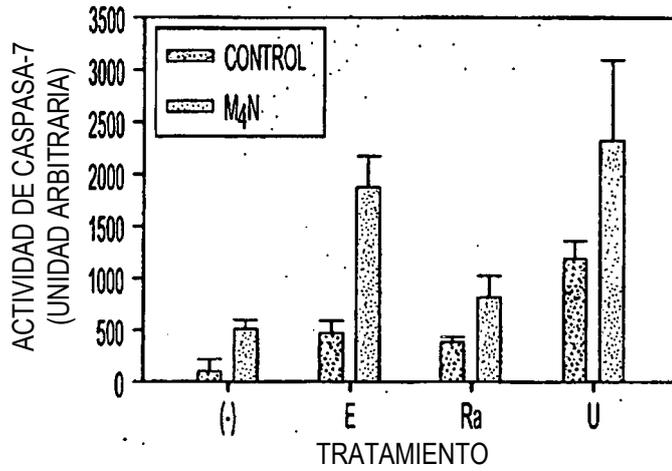


FIG. 1D

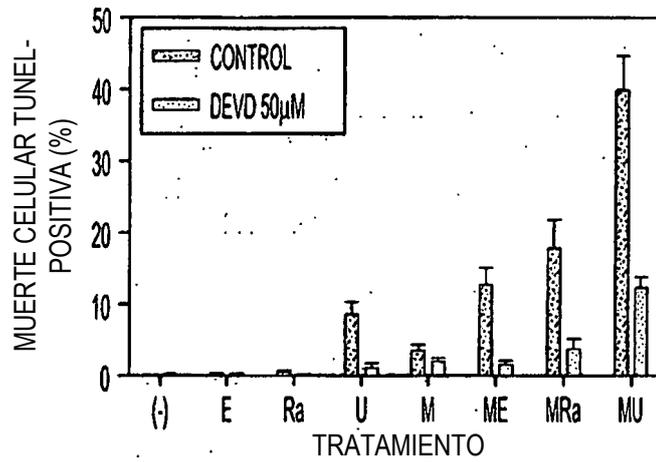


FIG. 1E

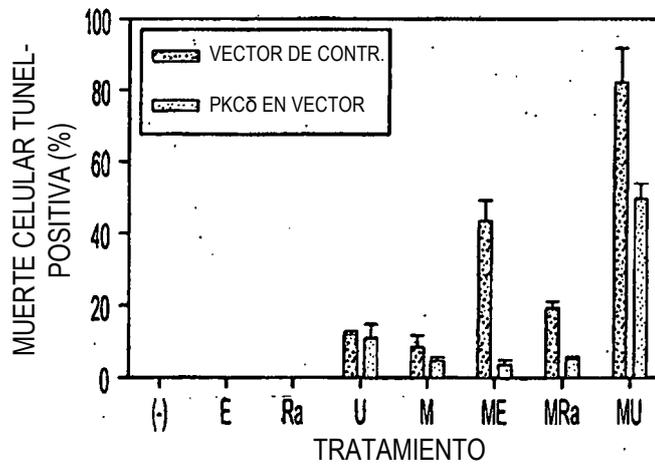


FIG. 1F

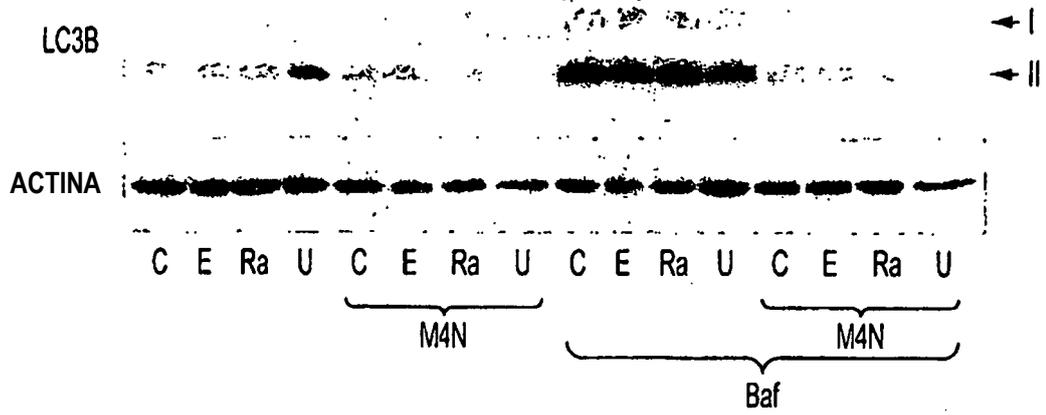


FIG. 2A

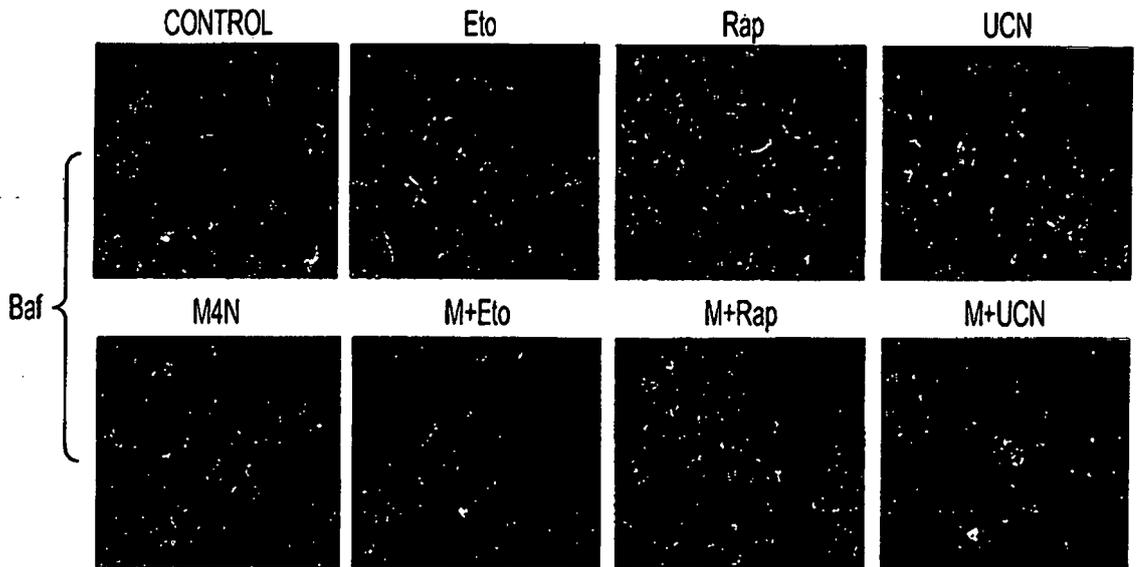


FIG. 2B

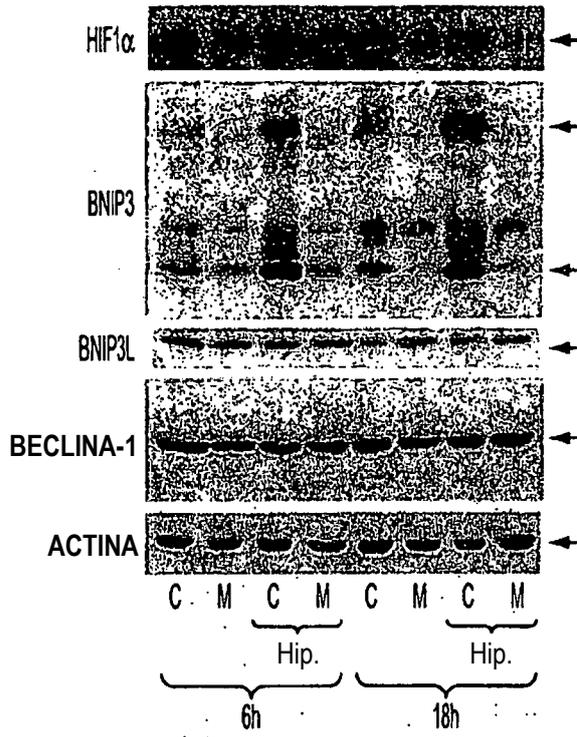


FIG. 3A

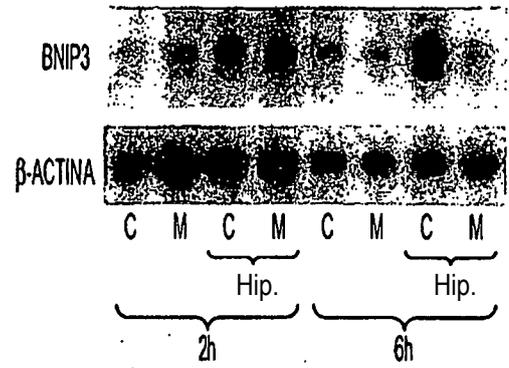


FIG. 3B



FIG. 3C

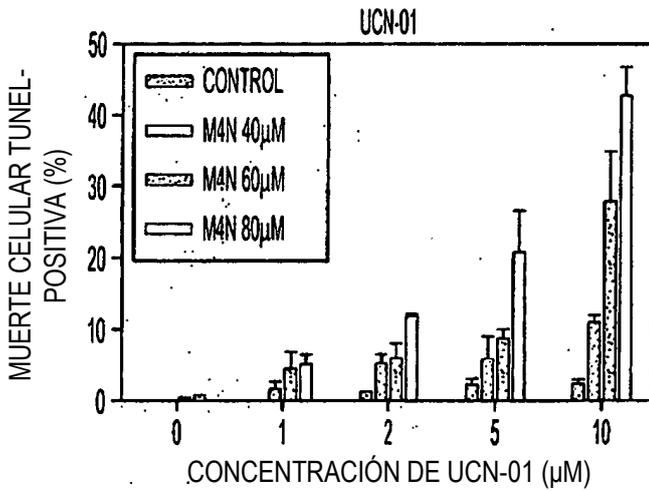
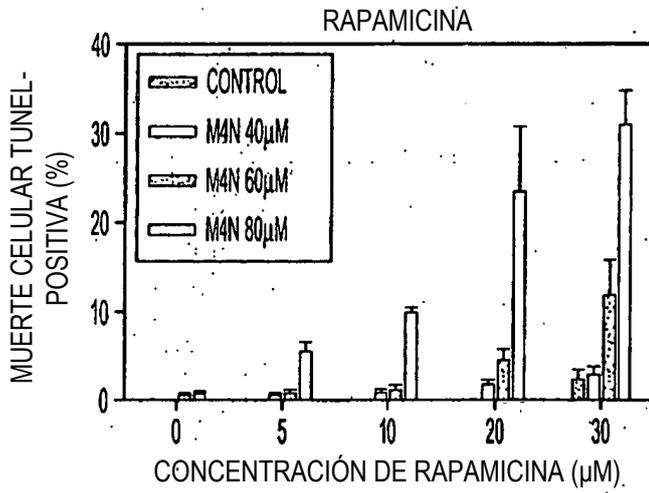
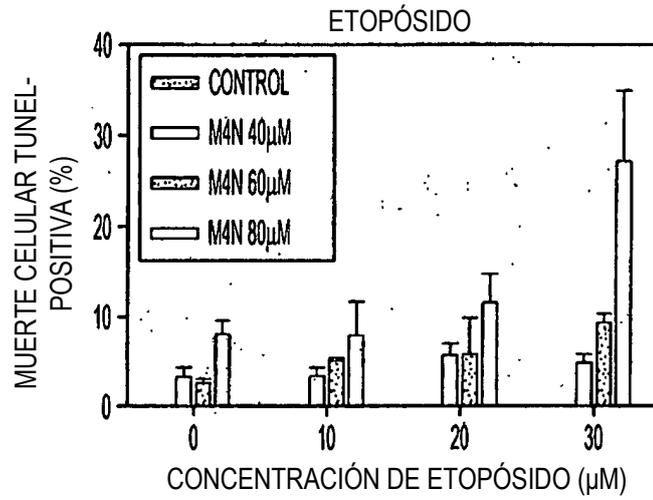


FIG. 4A

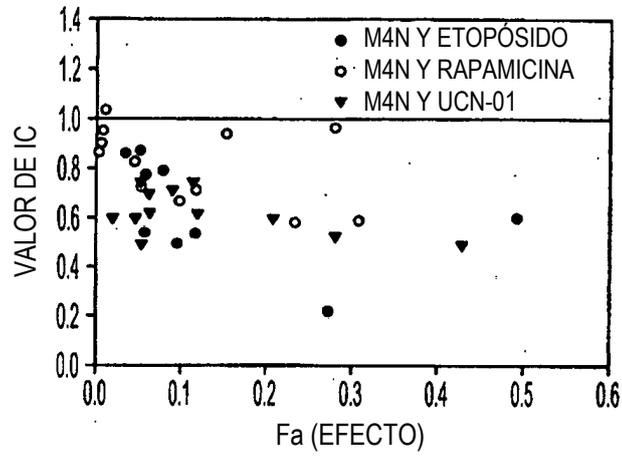


FIG. 4B

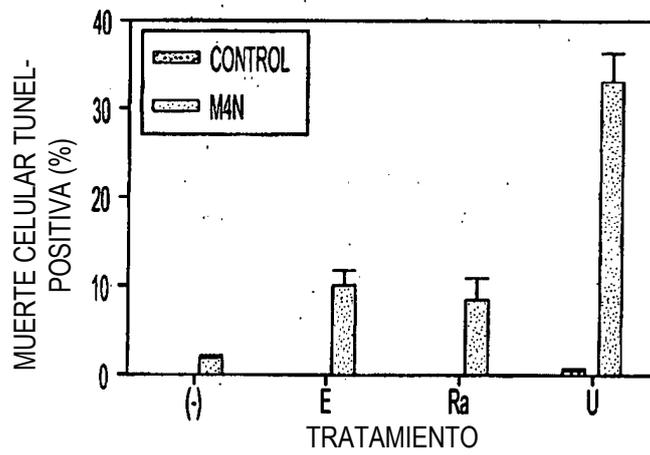


FIG. 4C

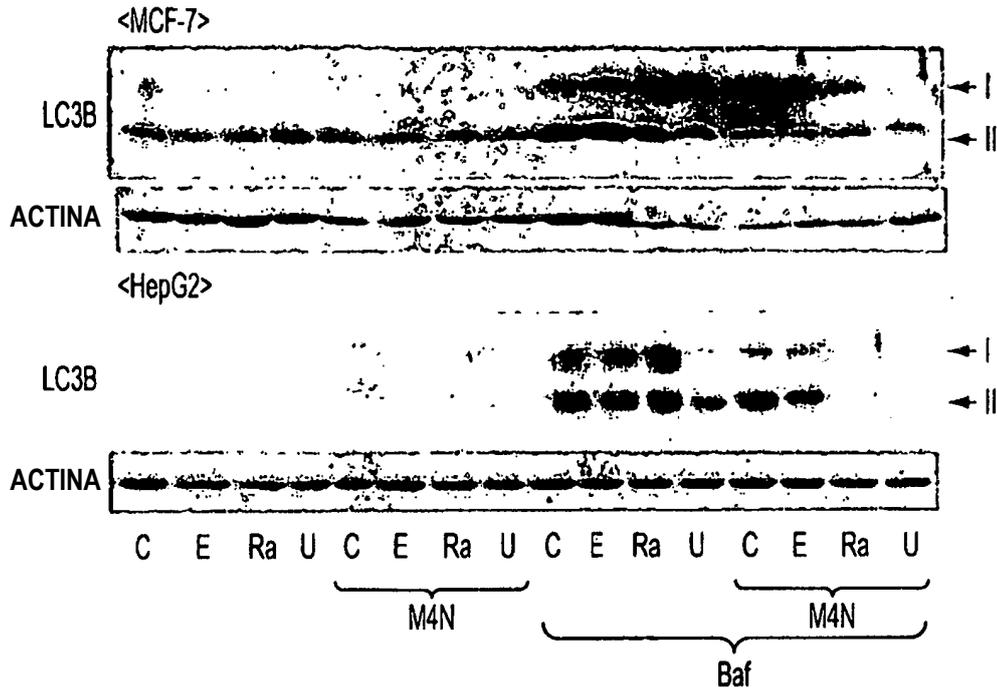


FIG. 4D

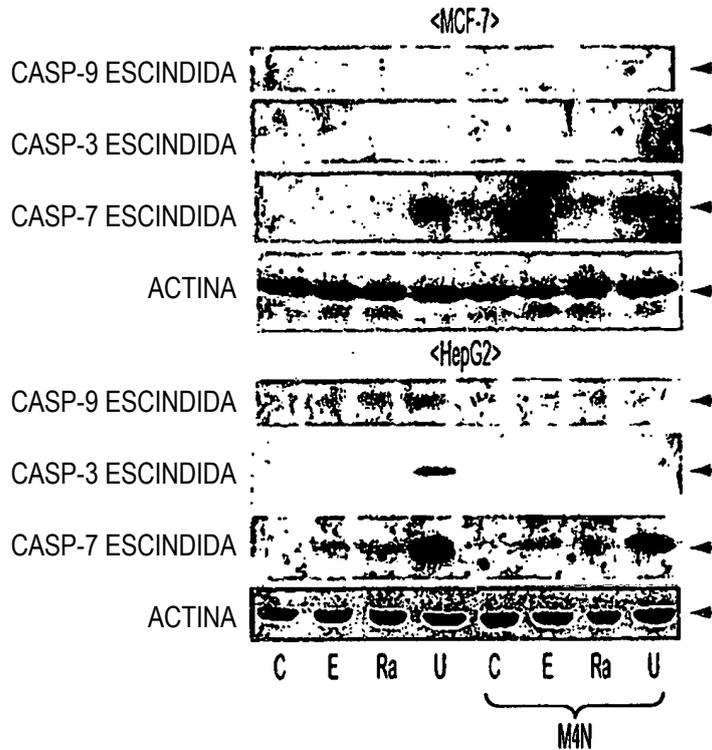


FIG. 4E

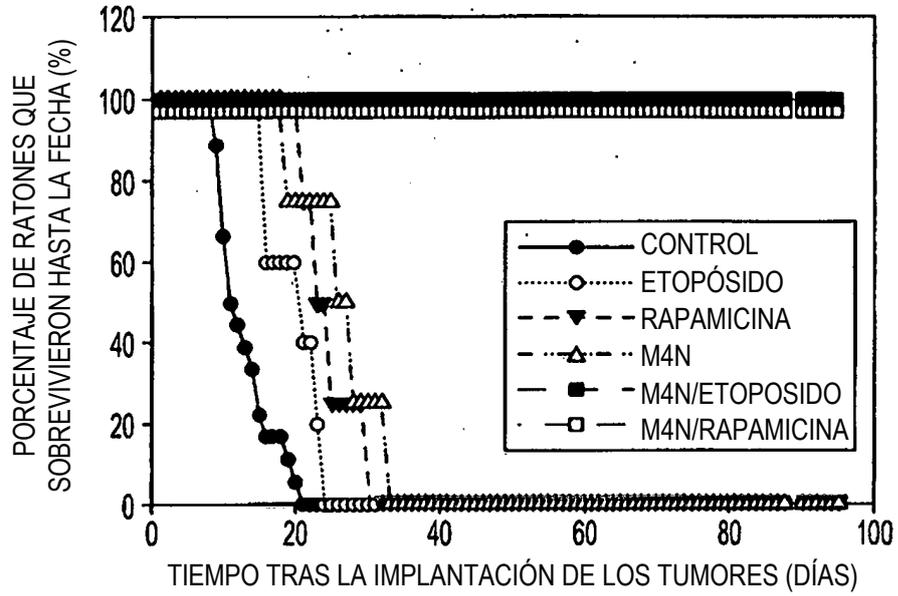


FIG. 5A

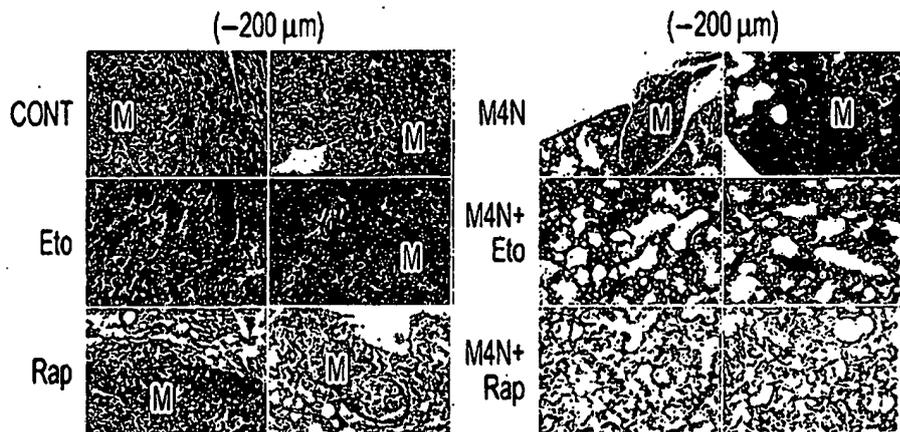


FIG. 5B

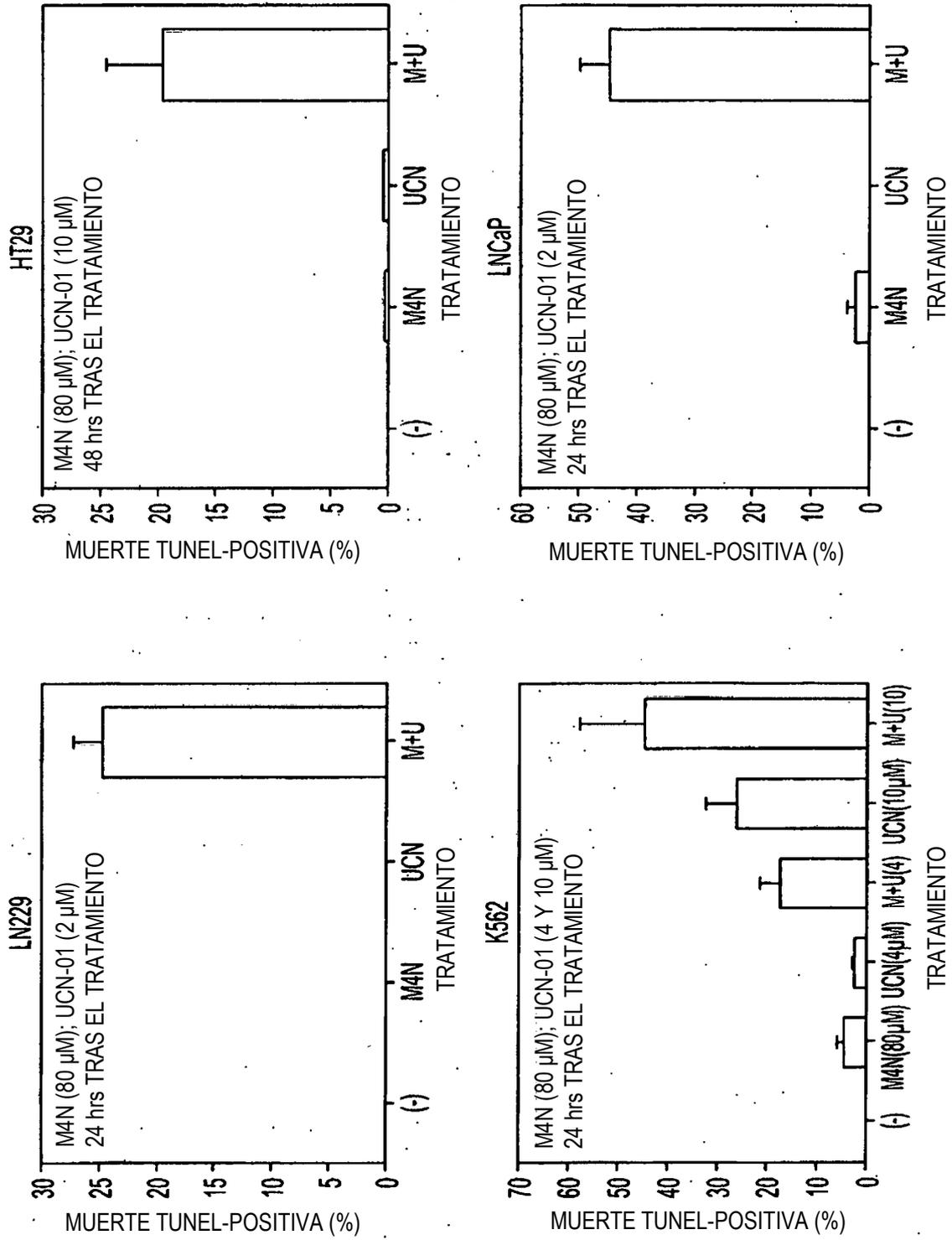


FIG. 6A

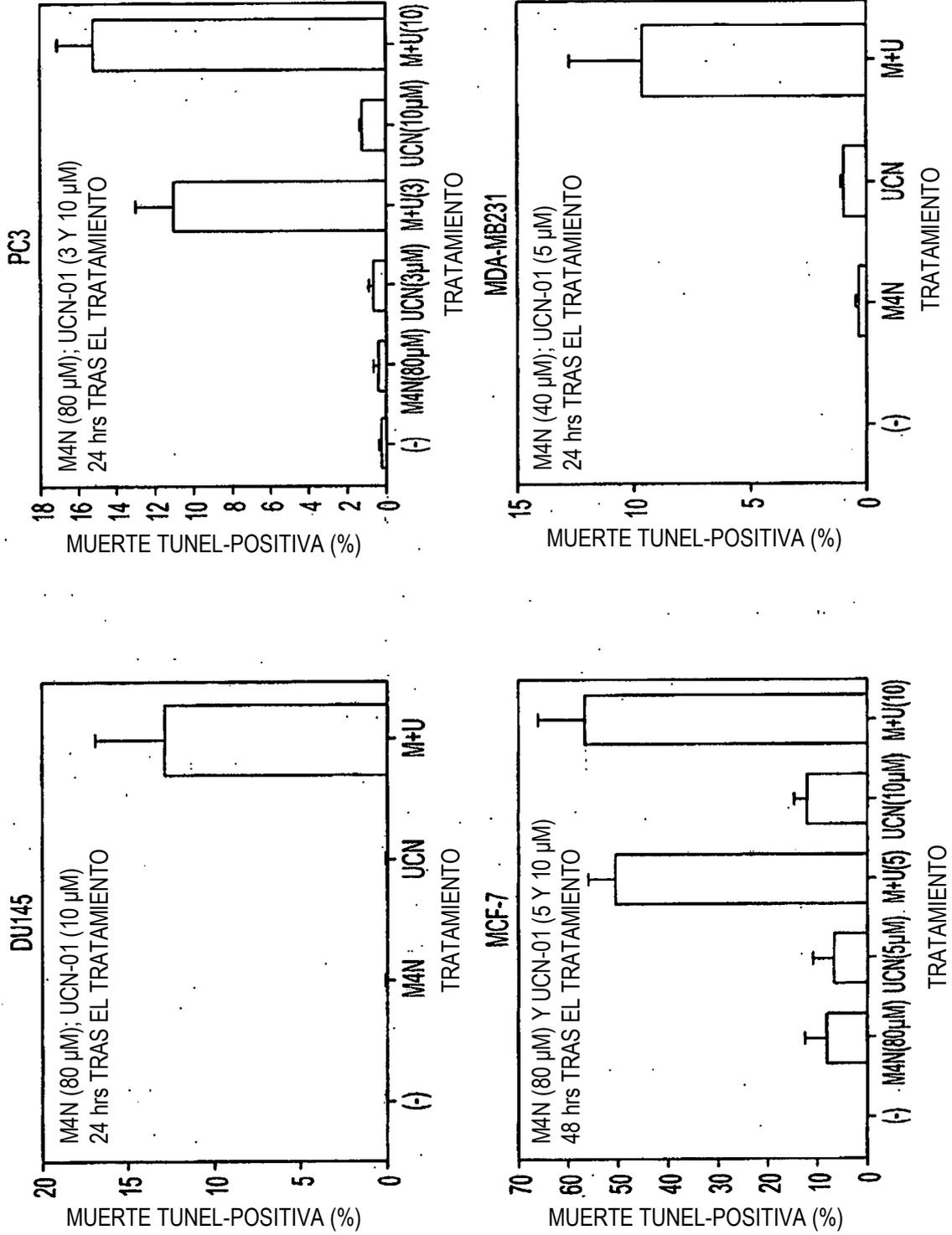


FIG. 6B

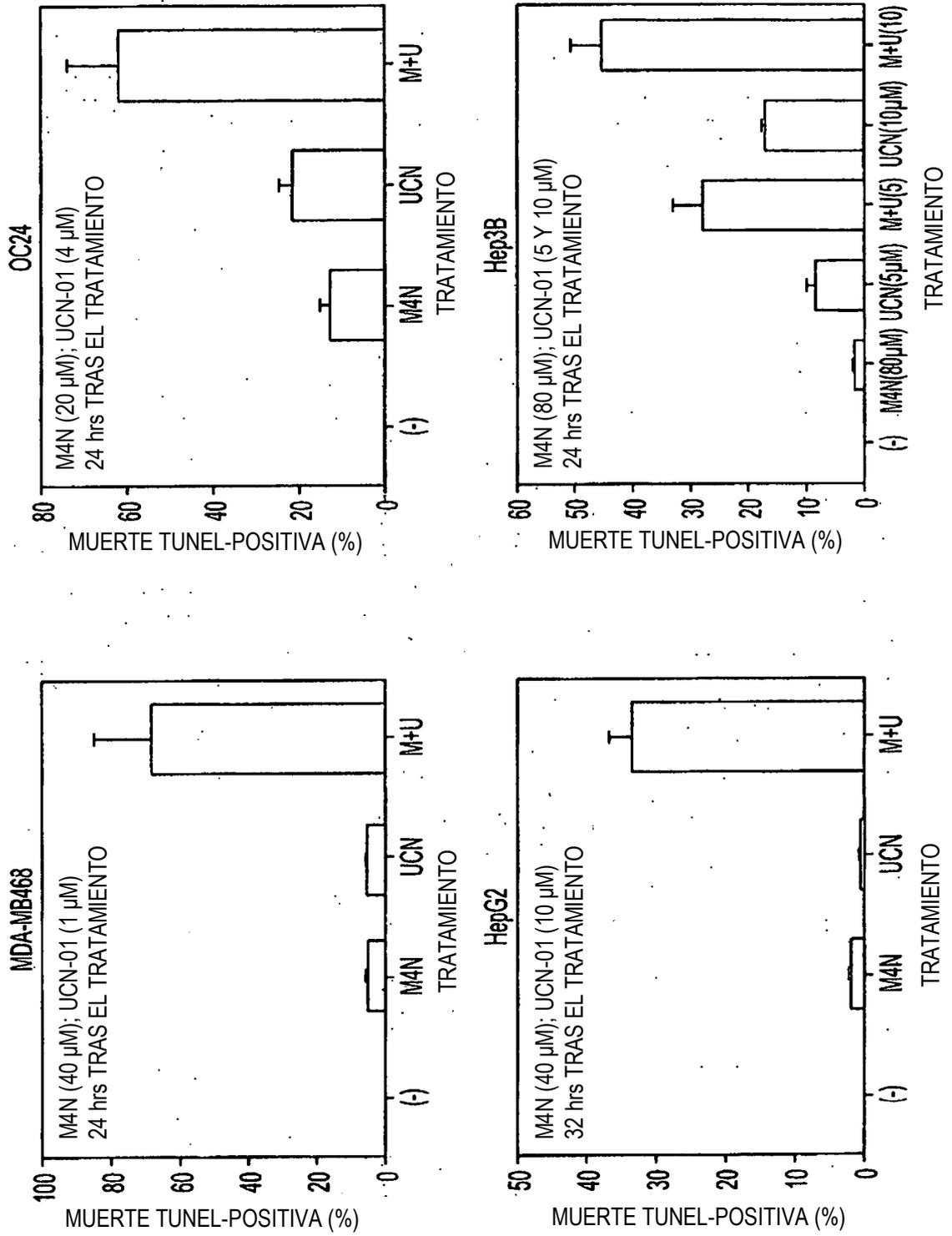


FIG. 6C

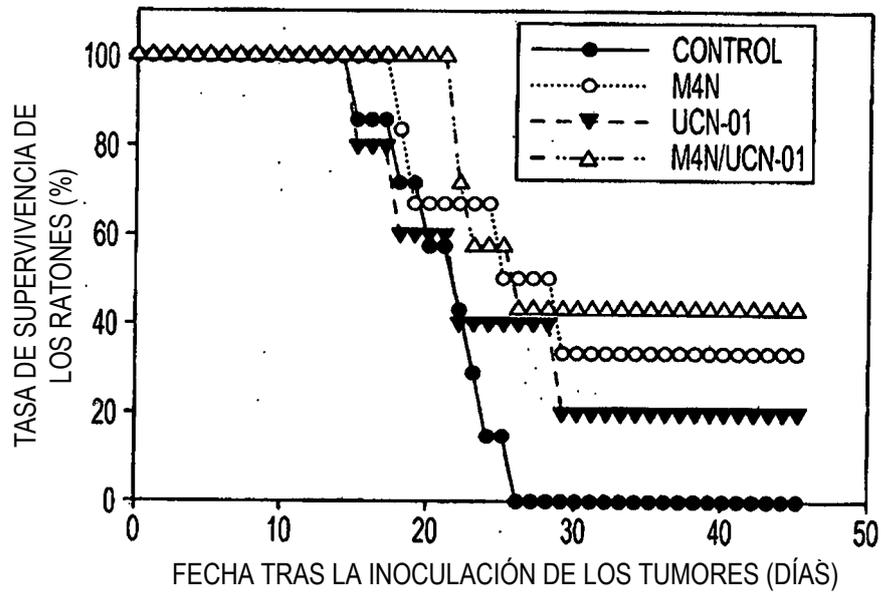


FIG. 7

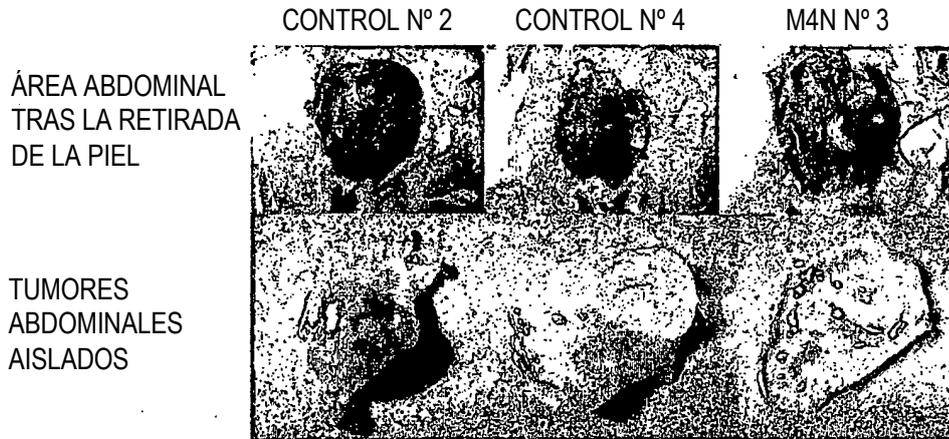


FIG. 8A



FIG. 8B

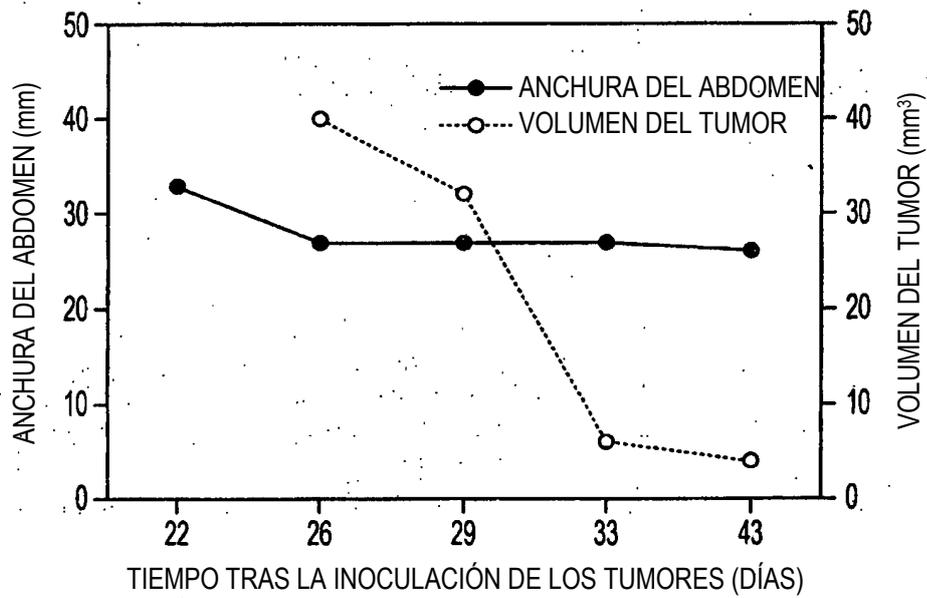


FIG. 8C