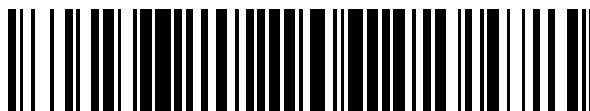


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 855**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198	(2006.01)	A61P 27/02	(2006.01)
A61K 31/203	(2006.01)		
A61K 31/282	(2006.01)		
A61K 31/201	(2006.01)		
A61K 31/454	(2006.01)		
A61K 39/395	(2006.01)		
A61K 31/7068	(2006.01)		
A61K 33/24	(2006.01)		
A61K 45/06	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2008** **PCT/US2008/077210**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2009** **WO09042542**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2008** **E 08832991 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017** **EP 2203162**

54 Título: **Derivado de la benzoquinona e3330 en combinación con agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer y la angiogénesis**

30 Prioridad:

26.09.2007 US 975396 P
21.11.2007 US 989566 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2018

73 Titular/es:

**INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND
TECHNOLOGY CORPORATION (100.0%)**
518 Indiana Avenue
Indianapolis, IN 46202 , US

72 Inventor/es:

KELLEY, MARK R.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 653 855 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

Derivado de la benzoquinona e3330 en combinación con agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer y la angiogénesis

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de las solicitudes provisionales de patentes de Estados Unidos núms. 60/989,566 presentada el 21 de noviembre de 2007, y 60/975,396 presentada el 26 de septiembre de 2007.

Campo de la invención

La presente invención se refiere, generalmente, a los campos de la biología molecular, bioquímica, y patología. Más específicamente, en ciertos aspectos, la invención se refiere a los inhibidores redox de Ape1/Ref-1 para su uso en el tratamiento del cáncer y para la inhibición de la angiogénesis.

Antecedentes de la invención

La nucleasa apurínica/apirimidínica (Ape1), se conoce, además, como factor efector redox (Ref-1) (de aquí en lo adelante, Ape1/ Ref-1) es una enzima con una doble función. Además de su actividad de reparación por escisión de bases de ADN (BER), la Ape1/Ref-1 funciona también como un efector redox que mantiene los factores de transcripción en un estado activo reducido (ver Figura 1).

Ape1/Ref-1 ha demostrado que estimula la actividad de unión al ADN de varios factores de la transcripción tales como HIF-1 α , NF κ B, AP-1 y p53, y otros conocidos y desconocidos, que están relacionados con la supervivencia y progresión tumoral (Evans y otros, *Mutat Res* 2000, 461, 83). Se ha mostrado que la expresión de Ape1/Ref-1 está alterada en una diversidad de cánceres que incluyen los tumores de mama, cervical, de células germinales, gliomas pediátricos y adultos, osteosarcomas, rhabdomyosarcomas, cáncer de pulmón de células no pequeñas y mieloma múltiple (Puglisi y otros, *Oncol Rep* 2002, 9, 11; Thomson y otros, *Am J Pediatr Hematol Oncol* 2001, 23, 234; Roberston y otros, *Cancer Res* 2001, 61, 2220; Puglisi y otros, *Anticancer Res* 2001, 21, 4041; Koukourakis y otros, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001, 50, 27; Kakolyris y otros, *Br J Cancer* 1998, 77, 1169; Bobola y otros, *Clin Cancer Res* 2001, 7, 3510). La expresión alta de Ape1/Ref-1 se ha asociado, además, con un resultado pobre en la quimiorradioterapia, una tasa de respuesta completa pobre, un intervalo libre de recaídas locales más corto, supervivencia más pobre y angiogénesis elevada (Koukourakis y otros, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001, 50, 27; Kakolyris y otros, *Br J Cancer* 1998, 77, 1169; Bobola y otros, *Clin Cancer Res* 2001, 7, 3510).

La angiogénesis es un componente importante del crecimiento, supervivencia, migración y metástasis del cáncer. La formación de nuevos vasos sanguíneos en el sitio de un tumor canceroso proporciona una fuente de nutrientes para acelerar el crecimiento y la expansión del tumor, así como un camino para que las células tumorales ingresen al torrente sanguíneo y se diseminen a otras partes del cuerpo. Así, la inhibición efectiva de la angiogénesis es un mecanismo útil para ralentizar o prevenir el crecimiento y la diseminación del cáncer. Un aumento en la actividad de Ape1/Ref-1 se ha asociado con la angiogénesis. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una importante proteína de señalización implicada tanto en la vasculogénesis como en la angiogénesis. Ape1/Ref-1 es un componente del complejo transcripcional inducible por hipoxia formado por el elemento de respuesta a hipoxia de los genes del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Ziel y otros, *Faseb J* 2004, 18, 986).

Además del cáncer, la angiogénesis alterada contribuye a afecciones patológicas relacionadas, entre otras, con las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades inflamatorias crónicas, la artritis reumatoide, la retinopatía diabética, la maculopatía degenerativa, las fibroplasias retrolentarias, la fibrosis pulmonar idiopática, el síndrome del distrés respiratorio agudo del adulto, el asma, la endometriosis, la psoriasis, los queloides y la esclerosis sistémica. La inhibición de la angiogénesis es un resultado clínico deseable para la mejoría o prevención de las enfermedades que implican una angiogénesis excesiva.

El documento de patente núm. US 2003/0229004 se refiere a los métodos y composiciones para inhibir la proliferación de las células y sensibilizar las células con la radioterapia y quimioterapéuticos dañinos para el ADN, y en particular, para tratar *in vivo* las células e individuos con cáncer, incluyendo los tratamientos intraoperatorios, mediante la administración de una combinación de fármacos quimio o radiosensibilizadores a ADN, inhibidores de la vía BER (reparación por escisión de la base del DNA) e inhibidores de la vía DSB (reparación de las bases del ADN de doble cadena).

Silber y otros, (*Clinical Cancer Research*, vol.8, 3008-3018, Septiembre 2002) describe la actividad de la endonucleasa apurínica/apirimidínica de Ape1/Ref-1 que contribuye a la resistencia de las células del glioma humano a los agentes alquilantes y se eleva por el estrés oxidativo.

Resumen de la invención

La inhibición dirigida de la función redox de Ape1/Ref-1 es un enfoque novedoso para el tratamiento del cáncer y la angiogénesis. En una modalidad, la presente invención se refiere a una cantidad eficaz de un agente que inhibe selectivamente la función redox de Ape1/Ref-1 para su uso en la inhibición de un trastorno fisiológico asociado con la angiogénesis alterada seleccionado de la retinopatía diabética, maculopatía degenerativa y fibroplasias retrolentarias; en donde el agente es el ácido 3-[(5-(2,3-dimetoxi-6-metil 1,4-benzoquinolil))-2-nonil-2-propenoico (E3330). En otra modalidad, la presente invención se refiere a una cantidad eficaz de un agente que inhibe selectivamente la función redox de Ape1/Ref-1 para su uso en la inhibición de un trastorno seleccionado del cáncer de páncreas, y gliomas adultos y pediátricos, en donde el agente es el ácido 3-[(5-(2,3-dimetoxi-6-metil 1,4-benzoquinolil))-2-nonil-2-propenoico (E3330).

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Papel redox de Ape1/Ref-1 en la regulación de factores de transcripción importantes en la supervivencia tumoral.
 Figura 2. Ensayo inmunoabsorbente unido a enzima de VEGF (ELISA).
 Figura 3. Ensayo ELISA de VEGF.
 Figura 4. Ensayo ELISA de VEGF.
 Figura 5. Ensayo ELISA de VEGF.
 Figura 6. Ensayo ELISA de VEGF.
 Figura 7. Ensayo ELISA de VEGF.
 Figura 8. Ensayo de formación de tubo capilar con el uso de células CB-ECFC sembradas en Matrigel.
 Figura 9. Ensayo de dilución limitante (LDA).
 Figura 10. Ensayo de proliferación de MTS con la proliferación de células endoteliales de la retina en células tratadas con o sin factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF).
 Figura 11. Efecto de E3330 (RN3-3) sobre la proliferación de células endoteliales vasculares de la retina (RVEC) de tipo silvestre/células sv40.
 Figura 12. Ensayo MTS con el uso de células tumorales MCF-7 derivadas del adenocarcinoma de mama humano. Ensayo de la sal de 3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio (MTS) usado para el análisis de la supervivencia/crecimiento de la célula.
 Figura 13. Ensayo MTS con el uso de células tumorales OVCAR-3 derivadas del adenocarcinoma de ovario humano.
 Figura 14. Efecto de E3330 (RN3-3) en combinación con el fármaco quimioterapéutico melfalán en las células de mieloma múltiple.
 Figura 15. Efecto de E3330 (RN3-3) en el ensayo MTS, en combinación con el fármaco quimioterapéutico melfalán en las células de mieloma múltiple después de 72 horas.
 Figura 16. Efecto de E3330 (RN3-3) y gemcitabina (0,25 µM) en células tumorales pancreáticas a las 24 y 48 horas.
 Figura 17. Ensayo de viabilidad celular MTS.
 Figura 18. Ensayo de viabilidad celular MTS.
 Figura 19. Peso corporal de ratones machos suministrados con E3330 (RN3-3) (0-50 mg/kg).
 Figura 20. Datos de la supervivencia de los ratones tratados con RN3-3 (E3330) en diversas cantidades y observados en los días 2, 3, 4 o 5 después del tratamiento.
 Figura 21. Datos farmacocinéticos de E3330 (RN3-3) durante un experimento cinético de 24 horas.
 Figura 22. Datos farmacocinéticos para E3330 (RN3-3).
 Figura 23. Efecto de E3330 (RN3-3) y el ácido retinoico sobre la promoción de la diferenciación celular.
 Figura 24. Análisis de apoptosis de las células HL-60 tratadas como se describe en la Figura 23 mediante el uso del ensayo de anexina/PI.
 Figura 25. Efecto de RN3-3 (E3330) y diversas dosis de RA.
 Figura 26. Efecto de E3330 (RN3-3) y RA en las células HL-60 sometidas a apoptosis (ensayo de anexina/PI).
 Figure 27. Efecto de E3330 (RN3-3) en combinación con la molécula pequeña de metoxiamina sobre las células de mieloma múltiple.

Descripción detallada

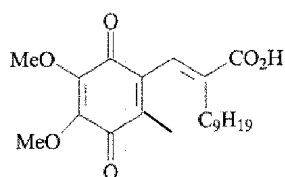
La presente invención se refiere al ácido 3-[(5-(2,3-dimetoxi-6-metil 1,4-benzoquinolil))-2-nonil-2-propenoico (E3330) que inhibe selectivamente la redox función de Ape1/Ref-1, para su uso en 1) la inhibición de un trastorno fisiológico asociado con la angiogénesis alterada, seleccionado de la retinopatía diabética, la maculopatía degenerativa y las fibroplasias retrolentarias; y 2) la inhibición de un trastorno seleccionado de cáncer de páncreas y gliomas de adultos y pediátricos. Dicha inhibición selectiva incluye la inhibición específica, o, en otras palabras, cuando no hay o no tiene el efecto apreciable sobre la función BER de Ape1/Ref-1, así como cuando el efecto predominante es sobre la función redox, en lugar de la función BER. La invención abarca, además, el uso de E3330 en combinación con los agentes quimioterapéuticos/terapéuticos adicionales. Se desea que los otros agentes actúen sobre un sujeto de una manera diferente a la del E3330 que inhibe selectivamente la función redox de Ape1/Ref1.

Los trastornos fisiológicos asociados con la angiogénesis alterada abarcan los trastornos asociados con la angiogénesis inapropiada, que son directa o indirectamente deletéreos para el sujeto. La angiogénesis alterada contribuye a las afecciones patológicas relacionadas, entre otros, con el cáncer (incluyendo crecimiento, supervivencia, migración,

microambiente y metástasis) y la enfermedad cardiovascular, la enfermedad inflamatoria crónica, la artritis reumatoide, la retinopatía diabética, la maculopatía degenerativa, las fibroplasias retrolentarias, la fibrosis pulmonar idiopática, el síndrome de distrés respiratorio agudo en adultos, el asma, la endometriosis, la psoriasis, los queloides y la esclerosis sistémica.

El término sujeto incluye los animales vertebrados, y preferentemente es un sujeto humano. El término inhibir, y sus derivados, incluye su significado generalmente aceptado, que incluye prohibir, prevenir, restringir y ralentizar, detener o revertir la progresión o gravedad. Así, se describen en la presente descripción tanto los tratamientos médicos terapéuticos como profilácticos. Como tal, un sujeto que los necesita, cuando se refiere a los usos terapéuticos de la presente descripción, es uno identificado que necesita o desea una intervención médica. Una cantidad eficaz es la cantidad necesaria de un agente para inhibir las enfermedades y trastornos patológicos descritos en la presente descripción. Cuando se administra al menos un agente terapéutico adicional a un sujeto, tales agentes pueden administrarse secuencialmente, acumulativamente o simultáneamente, para obtener los beneficios de los agentes.

La función redox de Ape1/Ref-1 se inhibió selectivamente por el ácido 3-[(5-(2,3-dimetoxi-6-metil 1,4-benzoquinol)-2-nonil-2-propiónico, más abajo) (de aquí en lo adelante, "E3330", denominado además como "RN3-3" en esta solicitud).



Puede encontrarse información adicional sobre E3330 en Abe y *otros*, documento de patente de los Estados Unidos núm. 5,210,239. Particularmente, se describen los procesos para preparar formulaciones y sales farmacéuticamente aceptables.

De manera interesante, nuestra investigación indica que el bloqueo selectivo de la función redox de Ape1/Ref-1 no causa apoptosis apreciable ni ninguna en las células normales. Se puede esperar muy bien que el bloqueo selectivo que resulta en un aumento de la apoptosis en células cancerosas podría dañar, además, a las células normales. Sin embargo, no se ha encontrado que este sea el caso.

Cuando se contemplan aplicaciones en sujetos, particularmente en humanos, será necesario preparar composiciones farmacéuticas en una forma apropiada para la aplicación prevista. Generalmente, esto implicará preparar composiciones que esencialmente están libres de impurezas, que podrían ser perjudiciales para un sujeto.

Los agentes pueden administrarse mediante la vía oral, intravenosa, intramuscular, intrapleural o intraperitoneal en dosis basadas en el peso corporal y el grado de progresión de la enfermedad del sujeto, y pueden administrarse en una, dos o incluso cuatro administraciones diarias.

Generalmente, será deseado emplear sales y tampones apropiados para producir agentes estables y permitir la absorción por las células objetivo. Las composiciones acuosas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz del agente, disuelto o disperso en un portador o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones se denominan, además, inocuas. La frase farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable se refiere a las entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones indeseadas, cuando se administran a un sujeto. Portador farmacéuticamente aceptable como se usa en la presente descripción, incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Se pueden incorporar además ingredientes activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones para su uso en la presente invención pueden incluir las preparaciones farmacéuticas clásicas. La administración de estas composiciones de acuerdo con la presente invención será a través de cualquier ruta común siempre que el tejido objetivo esté disponible a través de esa ruta. Esto incluye las vías oral, nasal, bucal, rectal, vaginal o tópica. Alternativamente, la administración puede ser mediante inyección ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa. Tales composiciones pueden administrarse, normalmente, como composiciones farmacéuticamente aceptables como se describió arriba.

Por ejemplo, los compuestos pueden formularse con excipientes, diluyentes, o portadores comunes, y formar tabletas, cápsulas, suspensiones, polvos, y similares. Los ejemplos de excipientes, diluyentes y portadores que son adecuados para tales formulaciones incluyen los siguientes: rellenos y extendedores tales como almidón, azúcares, manitol y derivados silícicos; agentes aglutinantes tales como carboximetilcelulosa y otros derivados de la celulosa, alginatos, gelatina y polivinilpirrolidona; agentes humectantes tales como glicerol; agentes disgregantes tales como carbonato de

calcio y bicarbonato de sodio; agentes para retardar la disolución tal como parafina; aceleradores de la resorción tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes tensioactivos tales como alcohol cetílico, monoestearato de glicerol; portadores adsorbentes tales como caolín y bentonita; y lubricantes tales como talco, estearato de calcio y magnesio, y polietilglicoles sólidos.

5

Los compuestos activos pueden, además, administrarse parenteral o intraperitonealmente. Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezclada con un surfactante, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones pueden prepararse además en glicerina, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

10

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen las dispersiones o soluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida hasta el punto que sea fácilmente inyectable. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería preservarse contra la acción de contaminación de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser además un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de estos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como la lecitina, con el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión, y con el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede proporcionarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timorosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede proporcionarse mediante el uso en las composiciones de agentes de absorción retardada, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

25

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el solvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requieran, seguido de la esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo además de cualquier ingrediente adicional deseado de una solución de este, anteriormente esterilizada por filtración.

30

Para la administración oral, los agentes pueden incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de enjuagues bucales y dentífricos no ingeribles. Puede prepararse un enjuague bucal que incorpore el ingrediente activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, tal como una solución de borato de sodio (Solución de Dobell). Alternativamente, el ingrediente activo puede incorporarse en un lavado antiséptico que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio. El ingrediente activo puede dispersarse además en dentífricos, incluidos geles, pastas, polvos y suspensiones acuosas. El ingrediente activo puede añadirse en una cantidad terapéuticamente efectiva a un dentífrico en pasta que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes y humectantes.

40

Las composiciones para su uso en la presente invención pueden formularse en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen la adición de ácidos a la sal (que se forman con los grupos de amino libres de las proteína) y las cuales se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales con los grupos carboxilo libres pueden derivarse además de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

45

Después de la formulación, las soluciones serán administradas de forma compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones son fácilmente administrables en una variedad de formas de dosificación tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, si es necesario, la solución debe regularse adecuadamente con tampón y primero, el diluyente líquido se torna isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, a la luz de la presente descripción los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermólisis o inyectarse en el sitio propuesto de infusión, (ver por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ta Edición, págs 1035-1038 y 1570-1580). Algunas variaciones en la dosificación ocurrirán necesariamente dependiendo de la afección del sujeto que va a tratarse. La persona responsable de la administración determinará en cualquier caso la dosis adecuada para el sujeto individual. Además, para la administración en humanos, las preparaciones alcanzan los estándares de esterilidad, seguridad general y pureza como se requiere por la FDA y las agencias contrapartes extranjeras.

55

60

Se demostró que la inhibición de la función redox de Ape1/Ref-1 disminuye la liberación de VEGF, deteriora la formación de tubos capilares e inhibe el crecimiento de colonias de números celulares grandes, lo que indica actividad

antiangiogénica. Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

5 Inhibición de la liberación de VEGF. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de VEGF (ELISA). Se sembraron en una placa de 24 pocillos varias líneas celulares de cáncer y se trataron por duplicado durante aproximadamente 24 horas en condición normóxica (aproximadamente 21% de oxígeno) o hipóxica (aproximadamente 2% de oxígeno). Los sobrenadantes de las células se recogieron y se sometieron a un ensayo ELISA con un estuche específico para VEGF humano de acuerdo con el fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los resultados del ensayo ELISA de VEGF se leyeron en un lector de placas de formato de 96 pocillos midiendo la absorbancia a 450 nm con corrección a 540 nm. La hipoxia indujo un aumento en la liberación de VEGF (Figura 2). (Para las Figuras 2-7, barras negras = normoxia, barras grises = hipoxia).

15 Ensayos ELISA de VEGF. Se sembraron células de Hey-C2 (cáncer de ovario), SKOV-3X (cáncer de ovario), Panc1 (cáncer de páncreas), PaCa-2 (cáncer de páncreas) e Igrov (cáncer de ovario) en una placa de 24 pocillos y se trataron por duplicado con E3330 (RN3-3e) a diferentes concentraciones durante aproximadamente 24 horas en condición normóxica (aproximadamente 21% de oxígeno) o hipóxica (aproximadamente 2% de oxígeno). Los sobrenadantes de las células se recogieron y se sometieron a un ensayo ELISA con un estuche específico para VEGF humano de acuerdo con el fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los resultados del ensayo ELISA de VEGF se leyeron en un lector de placas de formato de 96 pocillos midiendo la absorbancia a 450 nm con corrección a 540 nm. E3330 (RN3-3e) redujo la cantidad de liberación de VEGF de las células bajo condiciones de normoxia e hipoxia a través de la inhibición de la función redox de Ape1/Ref-1 (Figuras 2-7).

25 Inhibición de la formación de tubos capilares. El ensayo de formación de tubo capilar se realizó con el uso de células CB-ECFC cultivadas en Matrigel y tratadas con E3330 o medios de control. Las ECFC se cultivaron como se describió anteriormente (*Blood*, 1 noviembre 2004, Vol.104, núm. 9, págs. 2752-2760). Las colonias de ECFC aparecieron entre 5 y 22 días de cultivo. Las colonias se contaron mediante inspección visual con el uso de un microscopio invertido (Olympus, Lake Success, NY) bajo un aumento de 40x. Las células se sometieron a pases como se describió anteriormente. *Blood*, 1 noviembre 2004, Vol.104, núm. 9, págs. 2752-2760.)

30 El ensayo de formación de tubo se realizó como se describió anteriormente (*J. Biol. Chem.* 274 (1999), págs. 35562-35570). Antes de sembrar se administraron diversas concentraciones de E3330 a las CB-ECFC durante aproximadamente 30 min a temperatura ambiente y se sembraron en la capa de matrigel a una densidad de aproximadamente 1×10^4 células/pocillo. Después de aproximadamente ocho horas, se contaron las redes cerradas de los tubos completos a partir de campos seleccionados aleatoriamente y se fotografiaron bajo un microscopio. E3330 y sus análogos inhiben la formación de tubos, un indicador de angiogénesis e inhibición del crecimiento (Figura 8).

35 Ensayo de dilución limitante. E3330 inhibe el crecimiento de gran número de colonias celulares en el ensayo de dilución limitante (LDA) que es además un indicador de angiogénesis (Figura 9). Las ECFC se cultivaron como se describió anteriormente (*Blood*, 1 noviembre 2004, Vol.104, núm. 9, págs. 2752-2760). Las colonias de ECFC aparecieron entre 5 y 22 días de cultivo. Las colonias y el número de células por colonia se contaron mediante inspección visual con el uso de un microscopio invertido. E3330 inhibe el crecimiento de colonias de gran número de colonias en el ensayo de dilución limitante (LDA) que es además un indicador de angiogénesis. Las cantidades crecientes de E3330 (RN3-3) conducen a una disminución en el número de colonias con grandes cantidades de células y un aumento en las colonias con solo un pequeño número de células es indicativo de la inhibición del crecimiento celular. (Figura 9). (En la Figura 9, las barras son, de izquierda a derecha, EtOH y E3330 dosificadas a 25 μ M, 37,5 μ M, y 50 μ M.)

45 Inhibición de la proliferación de células endoteliales. E3330 a aproximadamente 10-100 μ M disminuyó la proliferación de células endoteliales de la retina en las células tratadas con o sin factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF). Los tejidos de la retina de ratón adulto joven se disecaron y digirieron. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se cultivaron hasta confluencia, luego se sembraron en placas de 96 pocillos para su ensayo. Tres días después de la siembra, el número total de células se analizó por medición de MTS (Promega). La tasa de proliferación se calculó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proliferaciones de las REC de diferentes grupos se compararon para significación estadística. E3330 (RN3-3) bloqueó la proliferación de REC indicativo de efectos contra la formación de vasos sanguíneos. (Figura 10)

50 10-100 μ M de E3330 disminuyó la proliferación celular de las células endoteliales vasculares de la retina (RVEC) (Figura 11). En los medios basales, E3330 inhibió la proliferación de las células REVC en las 4 concentraciones probadas, 10 μ M -57%, 25 μ M -93% ($p < 0,01$). La proliferación de REC se reforzó significativamente cuando se añadió bFGF en los medios. Además, se observó un efecto inhibitorio similar en los medios de bFGF a 10 μ M, 25 μ M y una concentración mayor de E3330.

60 Ensayo de formación de tubos in vitro. Además, se observó que en un ensayo que observa la formación de tubos in vitro, E3330, como Avastin, evitó la formación de túbulos de tipo vasos sanguíneos en las células endoteliales, de una manera dependiente de la dosis. En ese ensayo se observó también que un uso combinado de Avastin y E3330 fue sinérgicamente más efectivo que cualquiera de los dos solos

Ensayo de SNV en ratones knockout *vldl*^{-/-}. Se ha observado que el tratamiento intravítreo con E3330 reduce significativamente el número de neovascularización subretiniana (SNV) en la retina *vldl*^{-/-}. Se llevaron a cabo experimentos en ratones knockout de receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (*vldl*) para determinar el efecto de E3330 sobre la inhibición del desarrollo de SNV en el mutante *vldl*^{-/-}. Cada animal recibió una única inyección intravítrea de 1 µl de volumen de BSS como vehículo de control y el otro ojo recibió 1 µl de E3330 de 200 nm. La concentración final de E3330 fue equivalente a aproximadamente 20 µM en la retina. Una semana después del tratamiento se llevó a cabo la medición cuantitativa de SNV en todo el montaje de retina después de la tinción con lectina-FITC. Los resultados mostraron que 17/20 individuos tuvieron un número reducido de SNV en los ojos tratados con E3330 con ~ 30% de reducción. Por el contrario, ni el tratamiento con Avastin (anticuerpo VEGF) ni con el anticuerpo bFGF mostraron ningún signo de inhibición en el número de SNV. El aumento aparente de SNV después de la inyección de anticuerpos podría deberse a la respuesta inmune desencadenada por la proteína foránea que se informó anteriormente (Tator y otros, 2008). E3330 redujo el número de SNV en un nivel estadísticamente significativo ($p < 0,01$ en la prueba *t* apareada). Estos datos son muy alentadores ya que este modelo de proliferación angiomasiosa de la retina (RAP), similar a la humana, es difícil de tratar y no responde bien a los tratamientos disponibles actuales, incluyendo los agentes anti-VEGF y anti-bFGF. El inhibidor de Ape1/Ref-1 ofrece un nuevo enfoque para controlar la angiogénesis durante el tratamiento de la degeneración macular avanzada (AMD).

La presente invención abarca además una cantidad eficaz de un agente que inhibe selectivamente la función redox de Ape 1/Ref-1 para su uso en la inhibición de un trastorno seleccionado del cáncer de páncreas y gliomas de adultos y pediátricos, en donde el agente es el ácido 3-[(5-(2,3-dimetoxi-6-metil 1,4-benzoquinolil)-2-nonil-2-propenoico (E3330). Los cánceres descritos en la presente invención incluyen los tumores de mama, próstata, páncreas, colon, cervical, de células germinales, gliomas pediátricos y adultos, osteosarcomas, rabdomiosarcomas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemias y mieloma múltiple. Ape1/Ref-1 ha demostrado que estimula la actividad de unión al ADN de varios factores de transcripción tales como HIF-1 α , NF κ B, AP-1 y p53, que están relacionados con la supervivencia y progresión tumoral. La inhibición selectiva de la función redox de Ape1/Ref-1 por E3330 disminuye la unión de los factores de la transcripción al ADN y deteriora la capacidad para crecer de las células cancerosas. Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Supervivencia de las células cancerosas disminuida. Se alicuotaron las células MCF-7 u OVCAR-3 (aproximadamente 2-4000) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos por triplicado y se dejaron adherir durante la noche. E3330 (RN3-3) se añadió a los cultivos. Después de aproximadamente 24 o 72 h, se añadió a cada pocillo aproximadamente 0,05 mg/ml del reactivo sal de 3-(4-(5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenoxi)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio (MTS) y se incubó a aproximadamente 37° C durante aproximadamente 4 h, seguido por la medición de la absorbancia a 490 nm. Los valores se estandarizaron para los pocillos que contenían solamente medios. Independientemente, la dosis dependiente de E3330 destruyó las células tumorales MCF-7 derivadas de adenocarcinoma de mama humano (Figura 12) y células tumorales OVCAR-3 derivadas de adenocarcinoma ovárico humano (Figura 13). Pueden observarse efectos similares en las células derivadas de mieloma múltiple, próstata, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, colon y glioma. Por el contrario, en nuestros estudios no se observó una inhibición significativa del crecimiento con las células normales tales como células embrionarias hematopoyéticas o en células progenitoras CD34⁺ humanas. Estos datos son novedosos porque implican la función redox de Ape1/Ref-1 en el cáncer, pero no la supervivencia celular "normal".

Ensayo de migración de células de glioma. E3330 se probó para determinar si puede inhibir la capacidad de migración de las células de glioma SF767. Para realizarlo, se sembraron $1,5 \times 10^6$ células de SF767 en una placa de cultivo tisular de 60 mm y se dejaron crecer durante la noche y formar una monocapa confluyente. Se realizó un rasguño o herida a través de la placa con una punta de pipeta de 200 µl como se describió anteriormente (Liang 2007). Las células se enjuagaron después para eliminar las células flotantes y los medios contenían E3330 a 25, 50, 75 o 100 µM o el control de vehículo apropiado, DMSO. El medio que contenía fármaco se eliminó después de 24 horas y se añadió medio fresco. Después de que se agregó el fármaco, se tomaron imágenes en tres lugares marcados a lo largo del rasguño a las 0, 24, 36 y 48 h. La migración se cuantificó en diez lugares uniformes para cada imagen tomada con el uso del programa informático Spot (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) para medir la distancia en micras entre los bordes principales del rasguño. Cada conjunto de datos, un total de treinta para cada punto de datos, se normalizó con la migración del control de vehículo a las 0 h y se utilizó para determinar la desviación estándar. Los resultados indican que el E3330 inhibió la capacidad de las células SF767 para migrar, y exhibió una inhibición de hasta 4,0 veces en las células tratadas con E3330 de 100µM en comparación con el control de vehículo a las 48 h.

Nuestros resultados respaldan un efecto sobre el microambiente o estroma. El microambiente, que es distinto de las células cancerosas *por sí mismo*, juega un papel en la progresión del tumor, incluyendo la metástasis. Puede limitar el acceso de los productos terapéuticos al tumor, alterar el metabolismo de los mismos y contribuir a la resistencia contra el fármaco. Evidentemente, ser capaz de afectar el microambiente puede ayudar en los resultados terapéuticos finales logrados con respecto a los tumores.

En otra modalidad, la presente invención se refiere a E3330 que inhibe la función redox de Ape1/Ref-1 en combinación con otros agentes terapéuticos. Tales agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, melfalán, gemcitabina, cisplatino, metoxiamina, talidomida y sus derivados, y el ácido retinoico (RA). La inhibición selectiva de Ape1/Ref-1 puede actuar de forma sinérgica con otros agentes terapéuticos para aumentar la eficacia contra el cáncer. Así, pueden

administrarse dosis inferiores de agentes terapéuticos, que causan enfermedades y son tóxicas para las células normales a dosis más altas, sin una disminución de la eficacia contra el cáncer. El uso de agentes que inhiben selectivamente la función redox de Ape1/Ref-1 puede proporcionar protección a las células normales contra los efectos del cisplatino y otros compuestos quimioteráuticos. Los siguientes ejemplos son para fines ilustrativos.

E3330 en combinación con el quimioterápico Melfalán. E3330 en combinación con el fármaco quimioterápico melfalán mejoró sinérgicamente la destrucción de las células de mieloma múltiple (Figura 14). Los gráficos de sinérgismo se realizaron con el uso del programa informático CalcuSyn. E3330 se administró o bien, solo o en combinación con melfalán. Como indicador de roturas del ADN de doble cadena (DSB), se midió la fosforilación de la histona H2AX en Ser¹³⁹ con un anticuerpo específico para la fosforilación de H2AX de Upstate Cell Signaling Solutions (Waltham, MD). Las células se trataron con melfalán solo o melfalán con E3330. Después del tratamiento con el fármaco, las células que crecieron exponencialmente se recogieron, se lavaron en PBS frío y se lisaron en aproximadamente 100 µl de tampón de ensayo RIPA como se describió anteriormente. La proteína se cuantificó y se sometió a electroforesis en tampón de carga de gel de SDS en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Se usó anticuerpo monoclonal anti-fosfohistona H2AX (aproximadamente 1:1000) o anticuerpo anti-actina (aproximadamente 1:1000; como control de carga, LabVision Corp., NeoMarkers, Fremont, CA) para investigar los niveles de proteína como se describió anteriormente. Se detectaron las bandas usando un estuche de quimioluminiscencia de Roche Applied Biosciences (Indianapolis, IN). Las bandas se visualizaron con el uso de Bio-Rad Chemidoc XRS (Hercules, CA.) y cuantificaron mediante el uso del programa Chemidoc, Quantity One 4.6.1. Hay un aumento en los DSB en el melfalán con E3330 (RN3-3) en comparación con el melfalán solo.

E3330 (RN3-3) se aplicó en combinación con el fármaco quimioterápico melfalán y se encontró que mejora sinérgicamente la destrucción de las células de mieloma múltiple en el ensayo de MTS después de 72 horas (Figura 15). E3330 (RN3-3) se administró solo o en combinación con melfalán y la ED50 se representó gráficamente frente al control de porcentaje según el programa CalcuSyn, que se basa en el algoritmo de Chou-Talalay (Chou-Talalay; *Advances in Enzyme Regulation* 22, 27-55). El melfalán con E3330 (RN3-3) es más efectivo que cualquier agente solo.

E3330 en combinación con el quimioterápico Gemcitabina. E3330 mejoró los efectos inductores de la apoptosis de la gemcitabina (aproximadamente 0,25 µM) en las células tumorales pancreáticas (Figura 16). Para analizar las células en apoptosis, las células se colocaron en placas y se dejaron confluir durante la noche. Las células se trataron con E3330 solo o con gemcitabina. La apoptosis se analizó aproximadamente 24 y 48 horas después del tratamiento. Se tripsinizaron las células, se sedimentaron, se lavaron en PBS frío y se resuspendieron en tampón de unión 1x [aproximadamente HEPES/NaOH 10 mmol/L (pH 7,4), NaCl 140 mmol/L, CaCl₂ 2,5 mmol/L]. La apoptosis se analizó con el uso de Alexa Fluor 488 Anexina V del estuche de ensayo de Vybrant Apoptosis en combinación con yoduro de propidio (Molecular Probes, Eugene, OR) como se describió anteriormente *Clinical Cancer Research* 13, 260-267, enero 1, 2007. Las células que fueron fuertemente positivas a Anexina se consideraron positivas para la apoptosis. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en el servicio de citometría de flujo del Centro Oncológico de la Universidad de Indiana.

E3330 en combinación con el quimioterápico cisplatino. Las concentraciones de E3330 tan altas como aproximadamente 120 µM no perjudicaron la supervivencia de las células ganglionares de la raíz dorsal de rata que crecían en cultivo durante hasta aproximadamente 72 horas, según lo medido por el ensayo de viabilidad celular con MTS (Figura 17). No hubo ningún efecto de E3330 (RN3-3) en las células DRG posmitóticas, lo que es indicativo de un efecto no tóxico de E3330 (RN3-3) en las células que no se dividen.

Cultivos y tratamientos de células DRG se realizaron de forma similar a los procedimientos publicados anteriormente con el uso de E3330 solo (*DNA Repair* Volumen 4, núm. 3, marzo 2, 2005, págs. 367-379). Además, E3330 proporcionó protección contra los efectos neurotóxicos del quimioterápico cisplatino cuando se administró a células ganglionares de la raíz dorsal de rata (Figura 18). Esto demuestra que mientras que E3330 (RN3-3) mejora algunos agentes quimioteráuticos, tiene un efecto protector sobre células postmitóticas, que no se dividen (p. ej., las células DRG) incluso en presencia de un agente quimioterápico.

E3330 en combinación con el ácido retinoico. E3330 mejoró los efectos del ácido retinoico en la promoción de la diferenciación celular (Figura 23). Se trataron las células HL-60 ya sea con el vehículo (EtOH, control), E3330, ácido retinoico (RA) o E3330 y RA a las concentraciones indicadas y se determinó la morfología en el día seis. El análisis morfológico indicó un aumento en la diferenciación de las células HL-60 tratadas con E3330 (RN3-3). El análisis de apoptosis de las células HL-60 en el día 6 reveló que la combinación de E3330 y RA mostró un aumento en el número de células que experimentan apoptosis en comparación con las células tratadas con E3330 solo, y aproximadamente un aumento de 1,5 en la dosis de 25 µM de E3330 en comparación con RA solo (Figura 24).

E3330 mejoró el efecto de RA con dosis 1000 veces menor de RA, pero resultó en niveles similares de diferenciación con dosis más altas de RA. CD 11, que es un marcador para la diferenciación de HL-60, demostró que la adición de E3330 a RA emplea aproximadamente 1000 veces (3 órdenes de magnitud) menos RA que el que se requiere para tener el mismo nivel de diferenciación a dosis más altas de RA (Figura 25).

E3330 no mejoró significativamente el nivel de células HL-60 sometidas a apoptosis (ensayo de anexina/PI) a dosis más bajas de RA, aunque el nivel de diferenciación se mejoró grandemente en aproximadamente 1000 veces (Figura 26).

5 Estos resultados indican que E3330 con RA conduce a la diferenciación celular, pero no aumentó la apoptosis en estas células y el sistema modelo a las dosis reducidas de RA.

10 E3330 en combinación con Metoxiamina - células de mieloma múltiple. E3330 en combinación con la molécula pequeña de metoxiamina mejoró la destrucción de células de mieloma múltiple según lo evaluado por MTS (Figura 27). Los datos se calcularon con el uso del programa informático CalcuSyn que se basa en el algoritmo de Chou-Talalay (Chou-Talalay; *Advances in Enzyme Regulation* 22, 27-55). E3330 se administró o bien, solo o en combinación con metoxiamina.

15 Como indicador de roturas del ADN de doble cadena (DSB), se midió la fosforilación de la histona H2AX en Ser¹³⁹ con un anticuerpo específico para la fosforilación de H2AX de Upstate Cell Signaling Solutions (Waltham, MD). Las células se trataron con E3330 solo o E3330 con metoxiamina. Después del tratamiento con el fármaco, las células que crecieron exponencialmente se recogieron, se lavaron en PBS frío y se lisaron en aproximadamente 100 µl de tampón de ensayo RIPA como se describió anteriormente. La proteína se cuantificó y se sometió a electroforesis en tampón de carga de gel de SDS en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Se usó anticuerpo monoclonal anti-fosfohistona H2AX (aproximadamente 1:1000) o anticuerpo anti-actina (aproximadamente 1:1000; como control de carga, LabVision Corp., NeoMarkers, Fremont, CA) para investigar los niveles de proteína como se describió anteriormente. Se detectaron las bandas usando un estuche de quimioluminiscencia de Roche Applied Biosciences (Indianapolis, IN). Las bandas se visualizaron con el uso de Bio-Rad Chemidoc XRS (Hercules, CA) y se cuantificaron con el uso del programa informático Chemidoc, Quantity One 4.6.1.

25 E3330 en combinación con Metoxiamina - células pancreáticas. E3330 mejoró los efectos inductores de la apoptosis de la metoxiamina en el tumor pancreático. Para analizar las células en apoptosis, las células se colocaron en placas y se dejaron confluir durante la noche. Las células se trataron con E3330 solo o con metoxiamina. La apoptosis se ensayó aproximadamente 24 y 96 h después del tratamiento. Se tripsinizaron las células, se sedimentaron, se lavaron en PBS frío y se resuspendieron en tampón de unión 1x [aproximadamente HEPES/NaOH 10 mmol/L (pH 7,4), NaCl 140 mmol/L, CaCl₂ 2,5 mmol/L]. La apoptosis se analizó con el uso de Alexa Fluor 488 Anexina V del estuche de ensayo de Vybrant Apoptosis en combinación con yoduro de propidio (Molecular Probes, Eugene, OR) como se describió anteriormente *Clinical Cancer Research* 13, 260-267, enero 1, 2007. Las células que fueron fuertemente positivas a Anexina se consideraron positivas para la apoptosis. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en el servicio de citometría de flujo del Centro Oncológico de la Universidad de Indiana.

Experimentos preliminares in vivo. Se realizaron experimentos preliminares in vivo en ratones para explorar el perfil de seguridad y determinar las propiedades farmacocinéticas de E3330 (Figuras 19-22).

40 Figura 19. Peso corporal en ratones machos a que se les administró E3330 (RN3-3) (0-50 mg/kg). No se observó toxicidad en el ratón con E3330 (RN3-3) por debajo de 50 mg/kg. Los ratones se trataron con RN3-3 (E3330) y se pesaron dos días antes del tratamiento o después del tratamiento con las tres dosis del compuesto.

45 Figura 20. Datos de la supervivencia de los ratones tratados con RN3-3 (E3330) en diversas cantidades y observados en los días 2, 3, 4 o 5 después del tratamiento. El número de ratones supervivientes con respecto al número total se presenta como supervivencia/total.

50 Figura 21. Datos farmacocinéticos de E3330 (RN3-3) durante un experimento cinético de 24 horas. Se trataron los ratones con E3330 (RN3-3) y después se detectó la concentración sanguínea en el Núcleo de Farmacología Clínica y Analítica (CPAC). Se representa un gráfico de tiempo frente a la concentración de E3330 (RN3-3) y la concentración estimada se muestra en la tabla. Se usaron tres ratones en cada intervalo de tiempo y los datos muestran la media con SD (no se muestra) representadas para cada tiempo.

55 Figura 22. Datos farmacocinéticos para E3330 (RN3-3). Se recogieron datos de los estudios de supervivencia, peso y PK y se muestran en la tabla. Se determinó la vida media de RN3-3 (E3330) para ratones machos, hembras y combinados, así como su peso y concentraciones.

Reivindicaciones

- 5 1. Una cantidad eficaz de un agente que inhibe selectivamente la función redox de Ape1/Ref-1 para su uso en la inhibición de un trastorno fisiológico asociado con la angiogénesis alterada seleccionada de la retinopatía diabética, la maculopatía degenerativa y la fibroplasias retrolentarias; en donde el agente es el ácido 3-[(5-(2,3-dimetoxi-6-metil 1,4-benzoquinoil))-2-nonil-2-propenoico (E3330).
- 10 2. Un agente de acuerdo con la reivindicación 1 y al menos un agente terapéutico adicional de uso por separado, simultáneo o secuencial para inhibir un trastorno fisiológico asociado con la angiogénesis alterada seleccionada de la retinopatía diabética, la maculopatía degenerativa y las fibroplasias retrolentarias.
3. Un agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho agente terapéutico adicional es el ácido retinoico.
- 15 4. Una cantidad eficaz de un agente que inhibe selectivamente la función redox de Ape 1/Ref-1 para su uso en la inhibición de un trastorno seleccionado del cáncer de páncreas y los gliomas de adultos y pediátricos, en donde el agente es el ácido 3-[(5-(2,3-dimetoxi-6-metil 1,4-benzoquinoil))-2-nonil-2-propenoico (E3330).
- 20 5. Un agente de acuerdo con la reivindicación 4 y al menos un agente terapéutico adicional para su uso por separado, simultáneo o secuencial para inhibir el cáncer de páncreas o los gliomas adultos o pediátricos.
6. Un agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho agente terapéutico adicional se selecciona de melfalán, gemcitabina, cisplatino, talidomida y ácido retinoico.
- 25 7. Un agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho agente terapéutico adicional es bevacizumab.

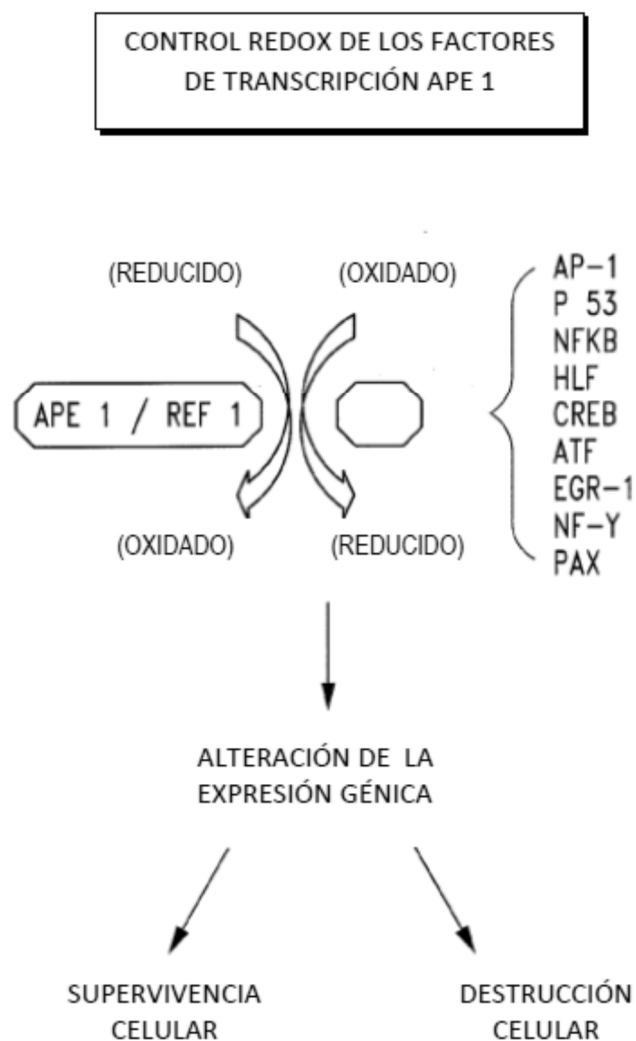


Fig. 1

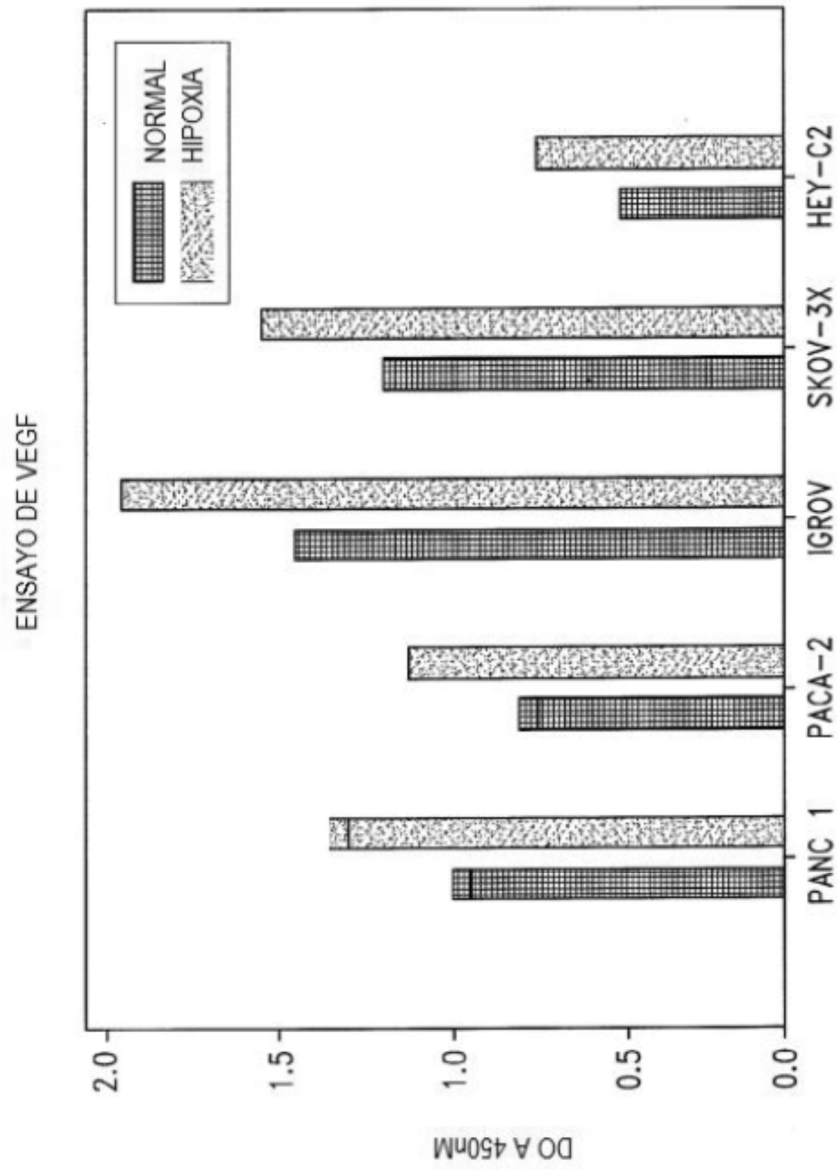


Fig.2

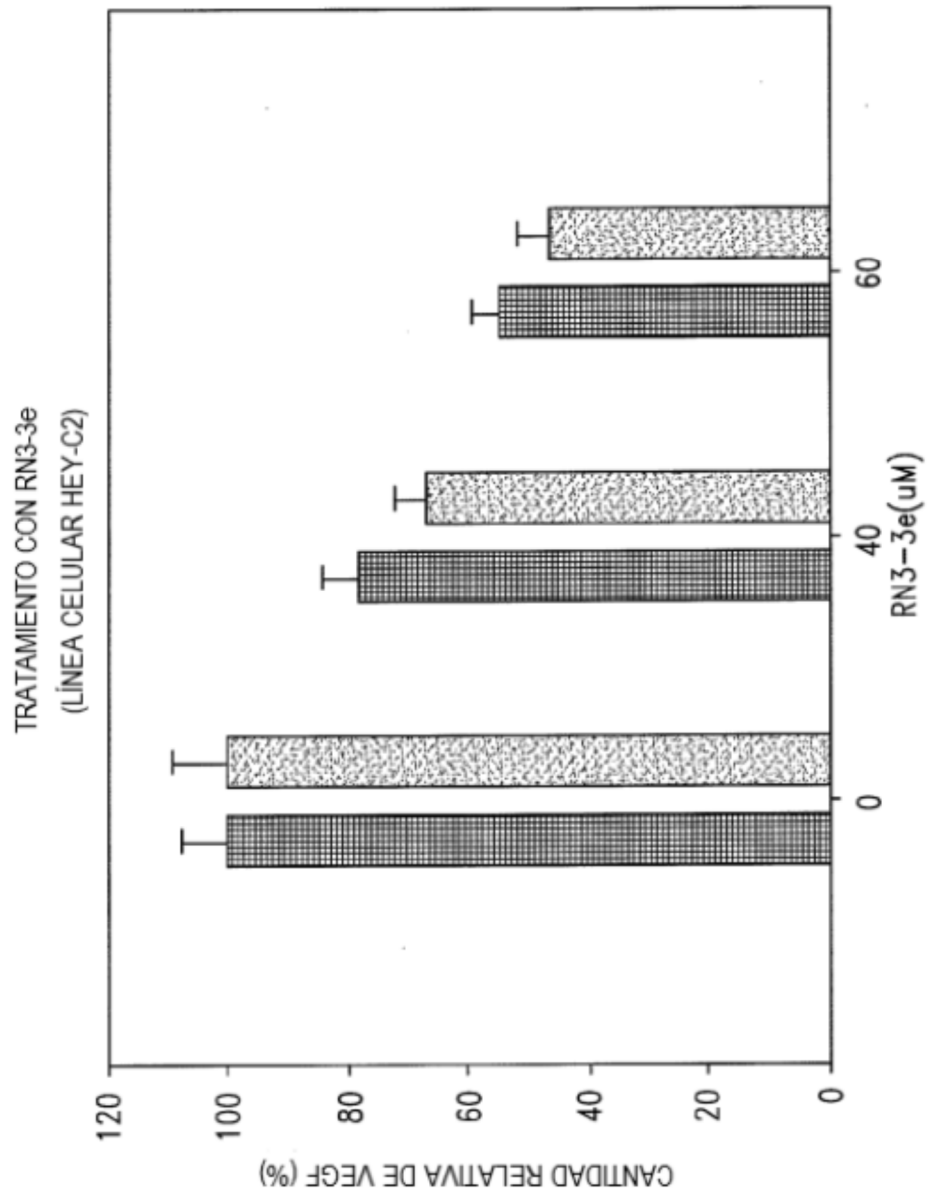


Fig.3A

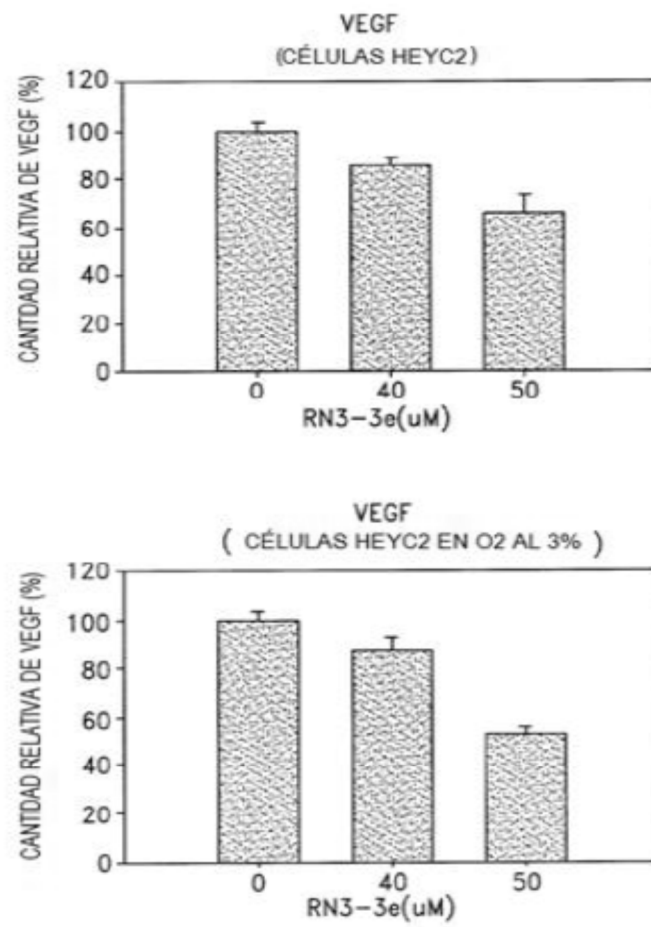


Fig. 3B

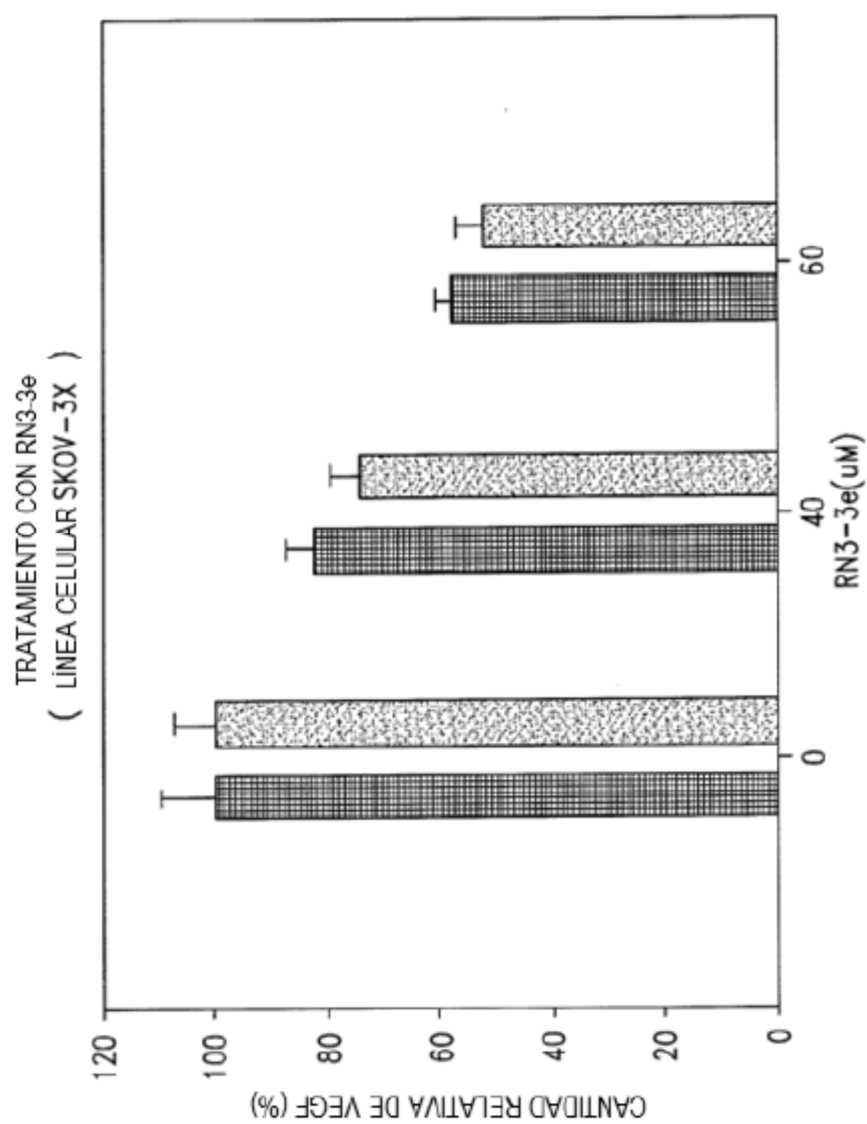


Fig. 4A

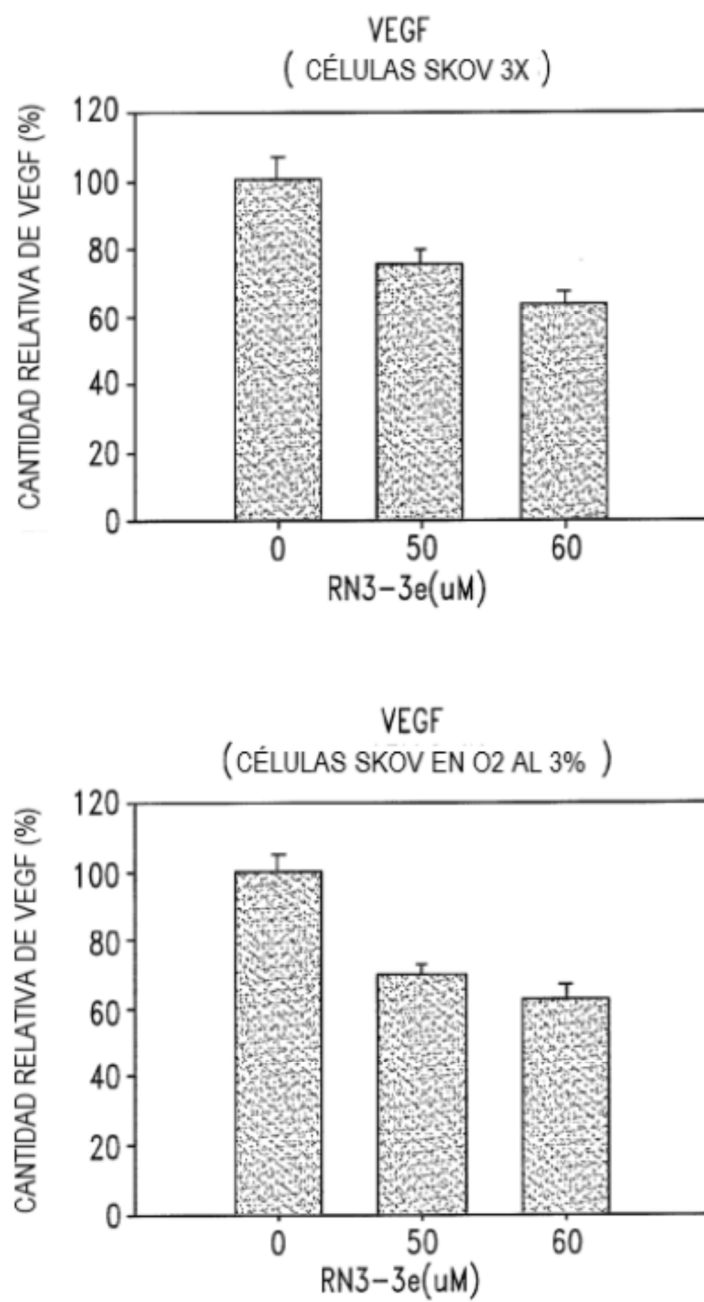


Fig. 4B

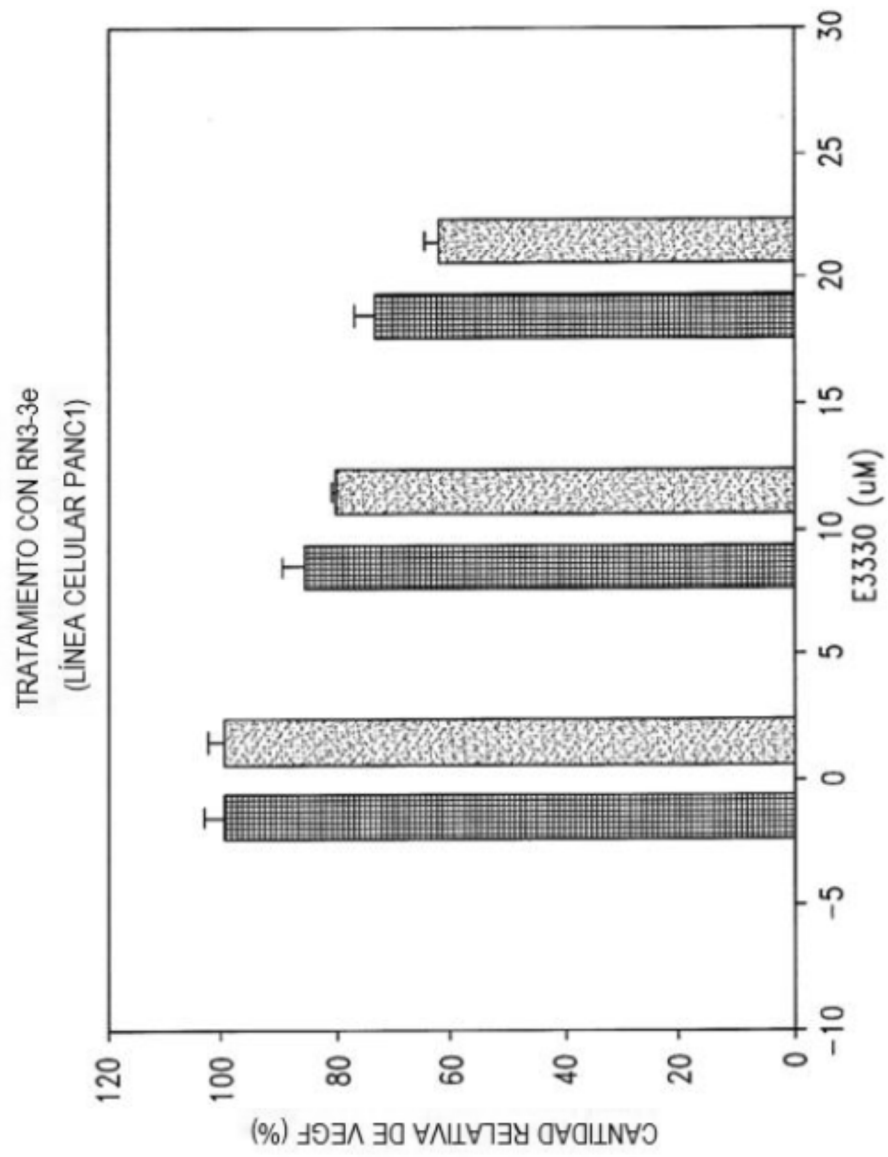


Fig.5

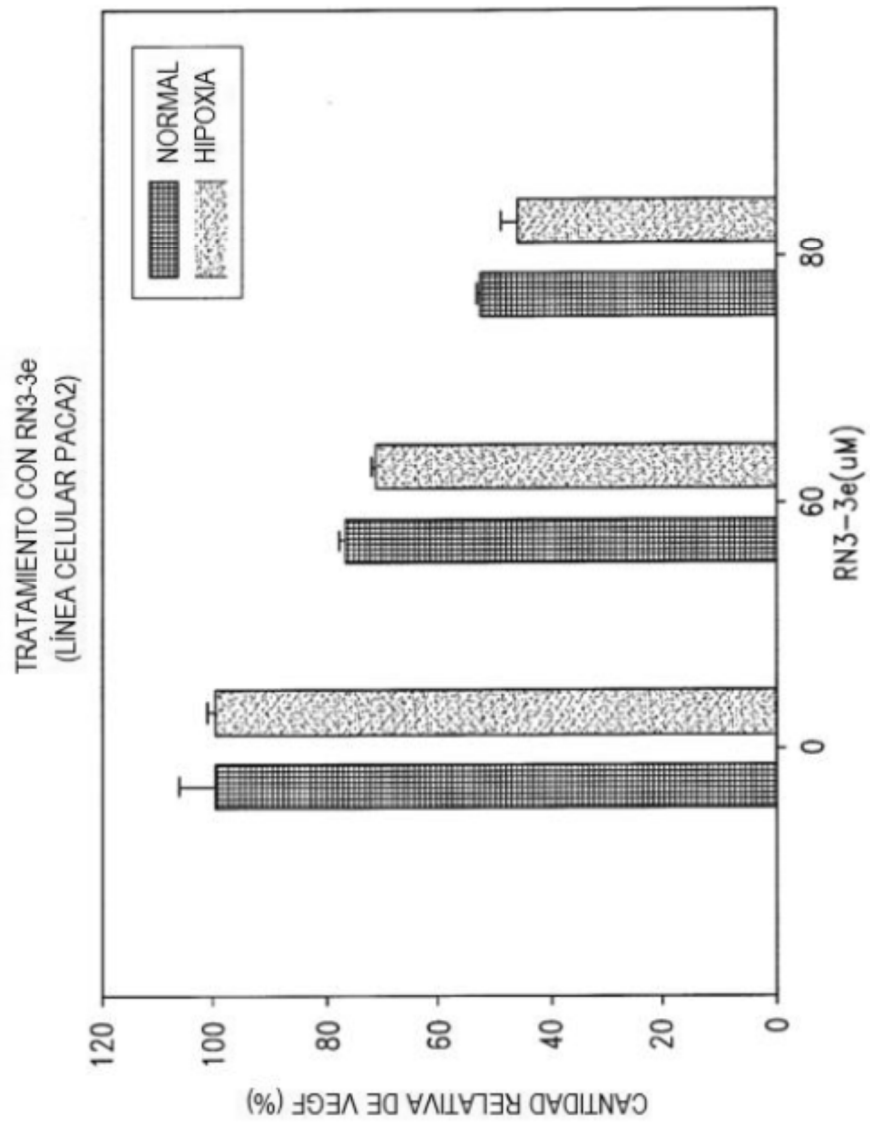


Fig.6

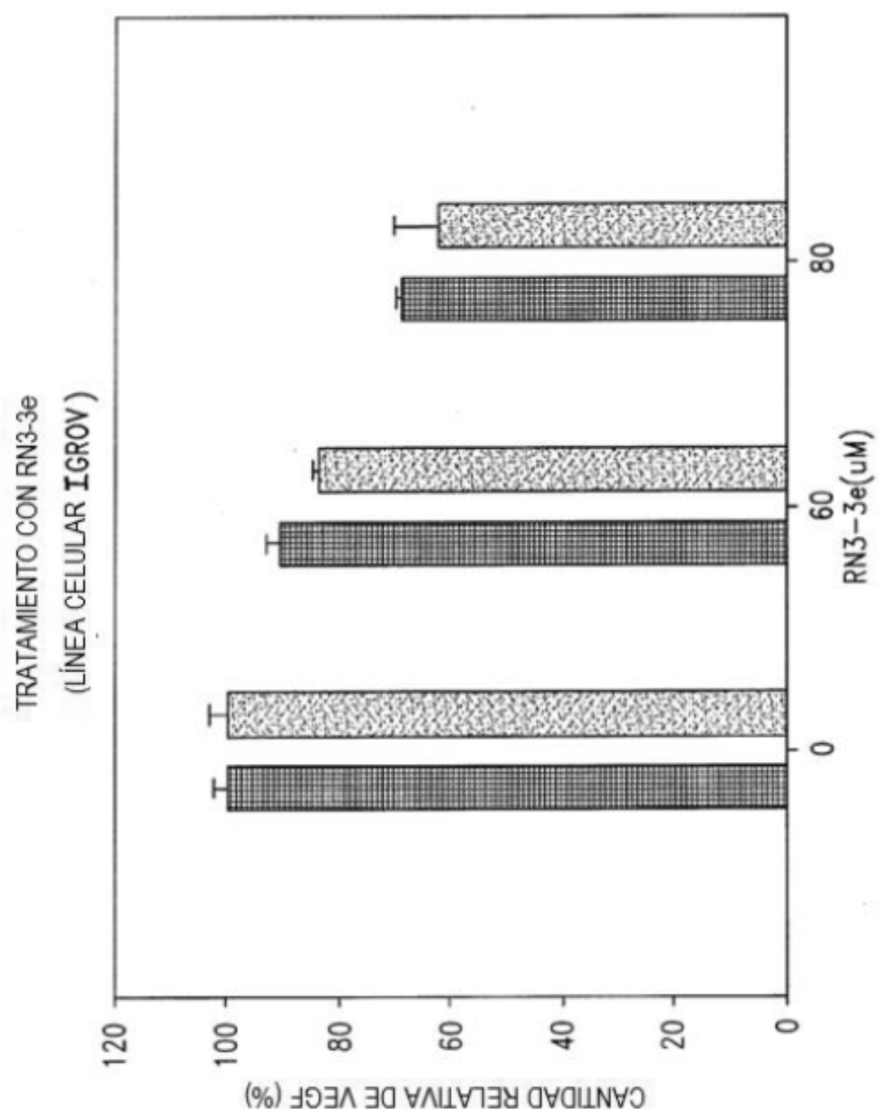


Fig 7

ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUBOS CAPILARES CON EL USO DE CÉLULAS
SEBRADAS EN MATRIGEL Y TRATADAS CON E3330 O MEDIOS CONTROLES

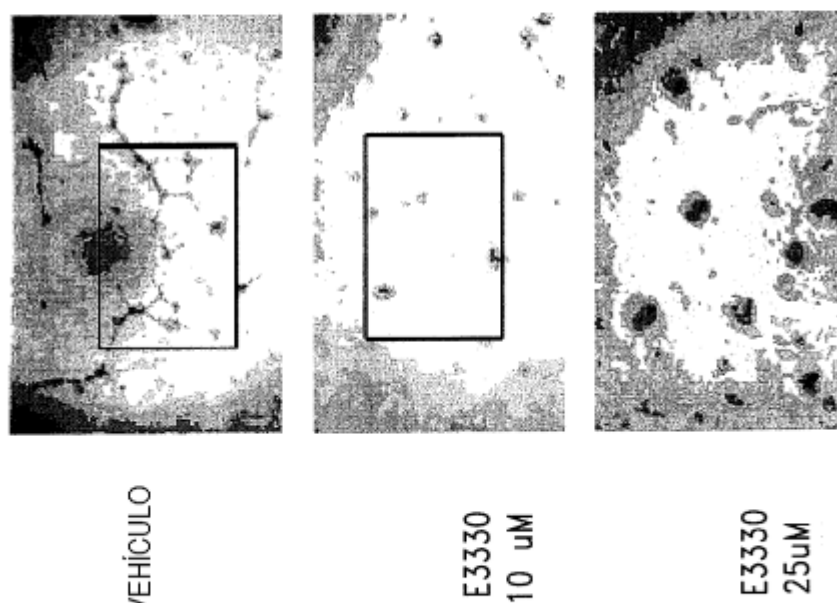


Fig 8

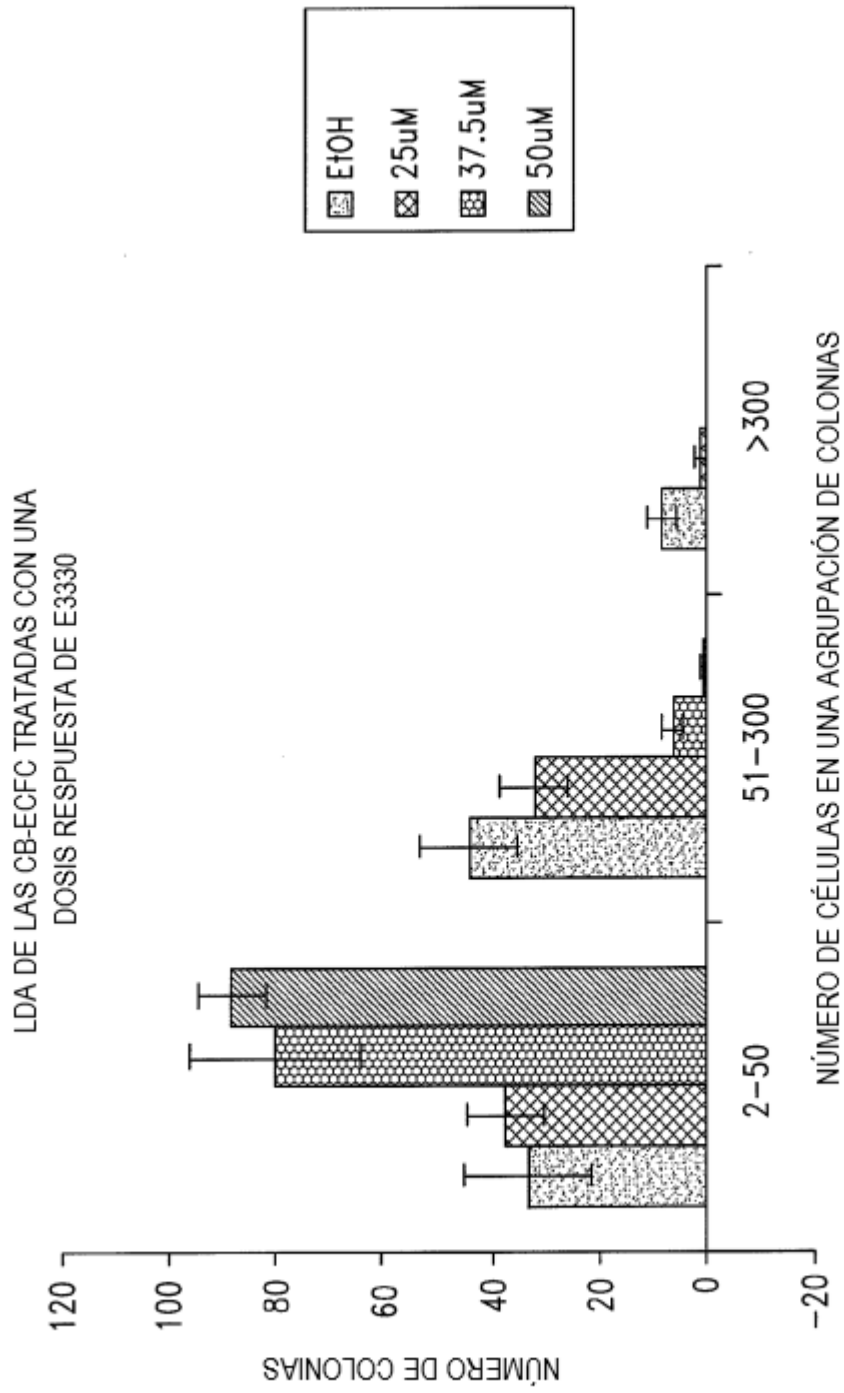


Fig 9

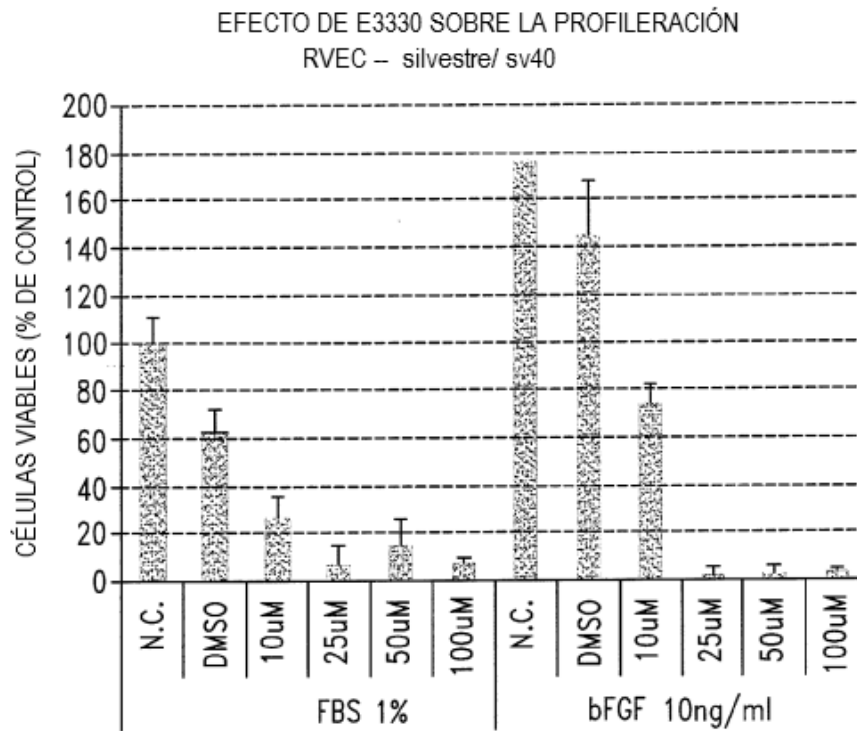
ENSAYO DE PROLIFERACIÓN MTS :

	EBM	EBM + bFGF
CONTROL	100 $\pm$ 11,03467	177,41
CONTROL DMSO	62,41 $\pm$ 9,5616	114,47 $\pm$ 23,1686
E3330 10 μ M	26,85 $\pm$ 8,6409	74,01 $\pm$ 8,2798
3330 25 μ M	6,586 $\pm$ 8,4687	1,861 $\pm$ 3,3570
3330 50 μ M	14,84 $\pm$ 10,9869	2,448 $\pm$ 3,6067
3330 100 μ M	7,713 $\pm$ 1,7757	3,462 $\pm$ 1,4779

VALOR DE P

	EBM	EBM + bFGF
DMSO– E3330 10 μ M	0,001489	0,001229
DMSO– E3330 25 μ M	0,000124	0,000019
DMSO– E3330 50 μ M	<0,001	<0,001
DMSO– E3330 100 μ M	<0,001	<0,001
E3330 10 μ M – 3330 25 μ M	0,006595	0,000003

Fig 10



ENSAYO DE PROLIFERACIÓN MTS, NÚMEROS IGUALES DE REC SE SEMBRARON EN CADA POCILLO DE UNA PLACA DE 96 POCILLOS, CADA GRUPO TUVO 5 POCILLOS (n = 5) DURANTE UN EXPERIMENTO SIMPLE. TRES DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA, EL NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS SE ENSAYARON POR LA MEDICIÓN DE MTS (PROMEGA). LA TASA DE PROLIFERACIÓN SE CALCULÓ DE ACUERDO CON LAS INSTRUCCIONES DEL FABRICANTE. LAS PROLIFERACIONES DE LAS REC DE GRUPOS DIFERENTES SE COMPARARON PARA SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA.

Fig 11

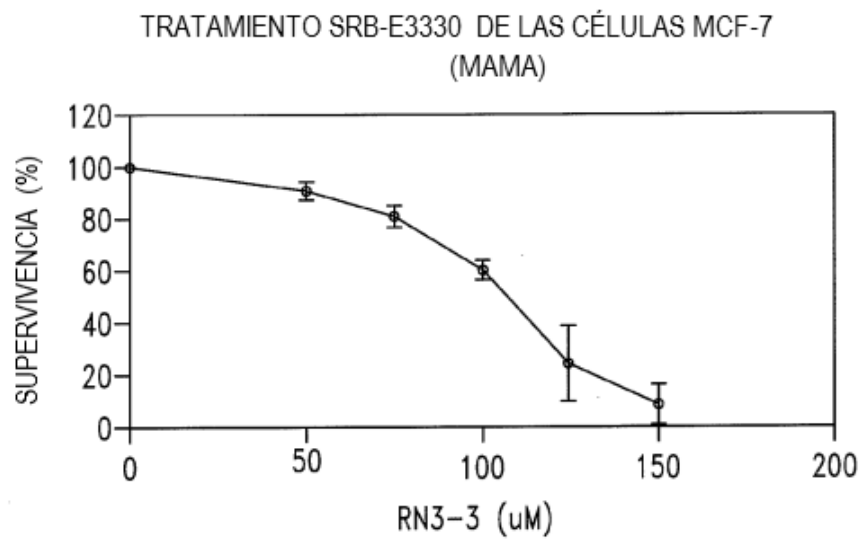


Fig 12

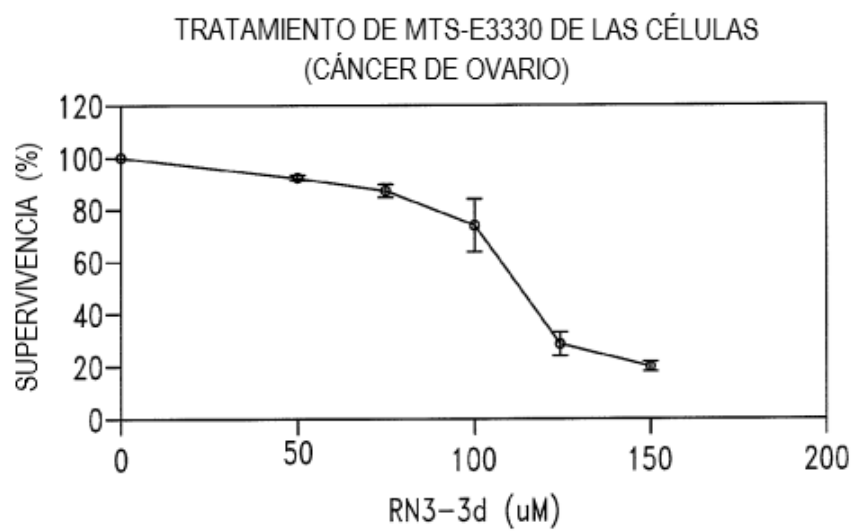


Fig 13

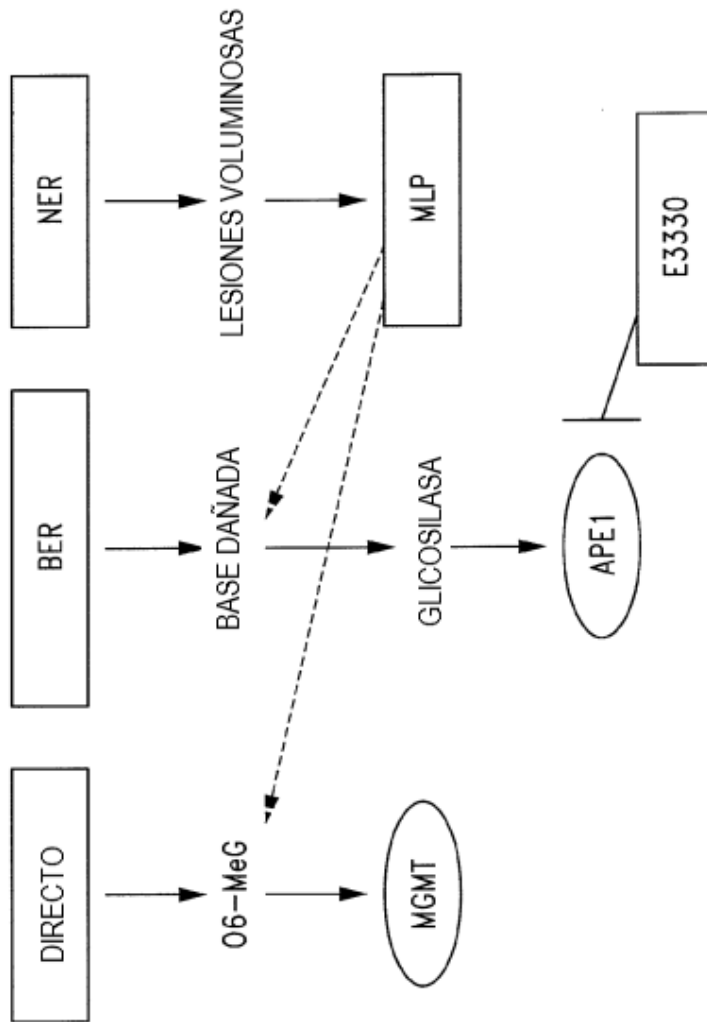


Fig 14A



Fig. 14 B

ENSAYO DE MTS - CÉLULAS 8226 TRATADAS CON E3330 MLP +/- 72h
n = 4

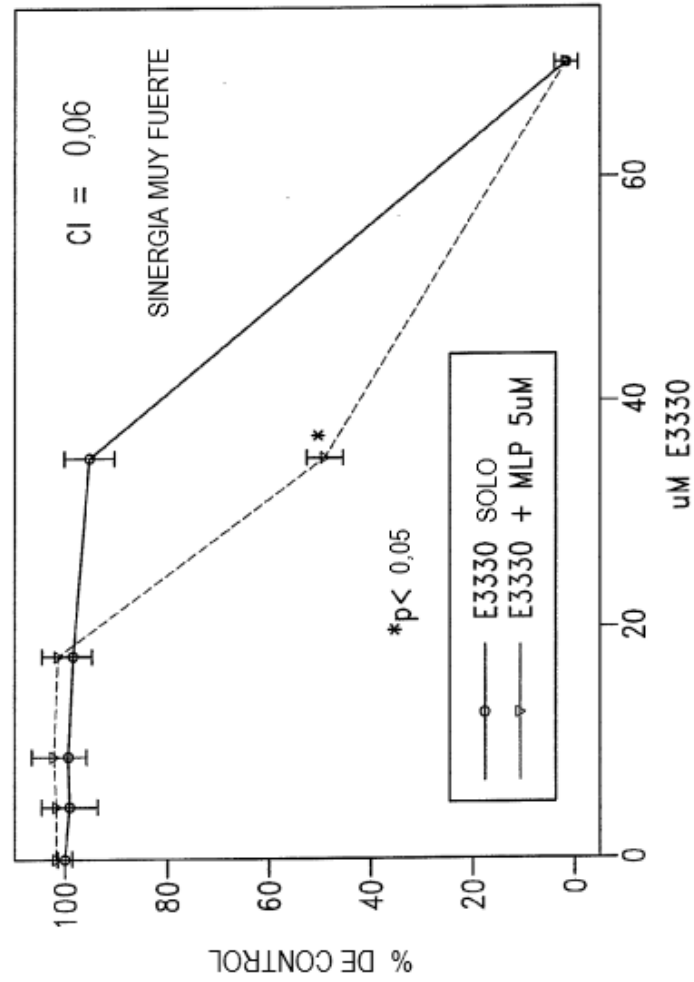


Fig 14C

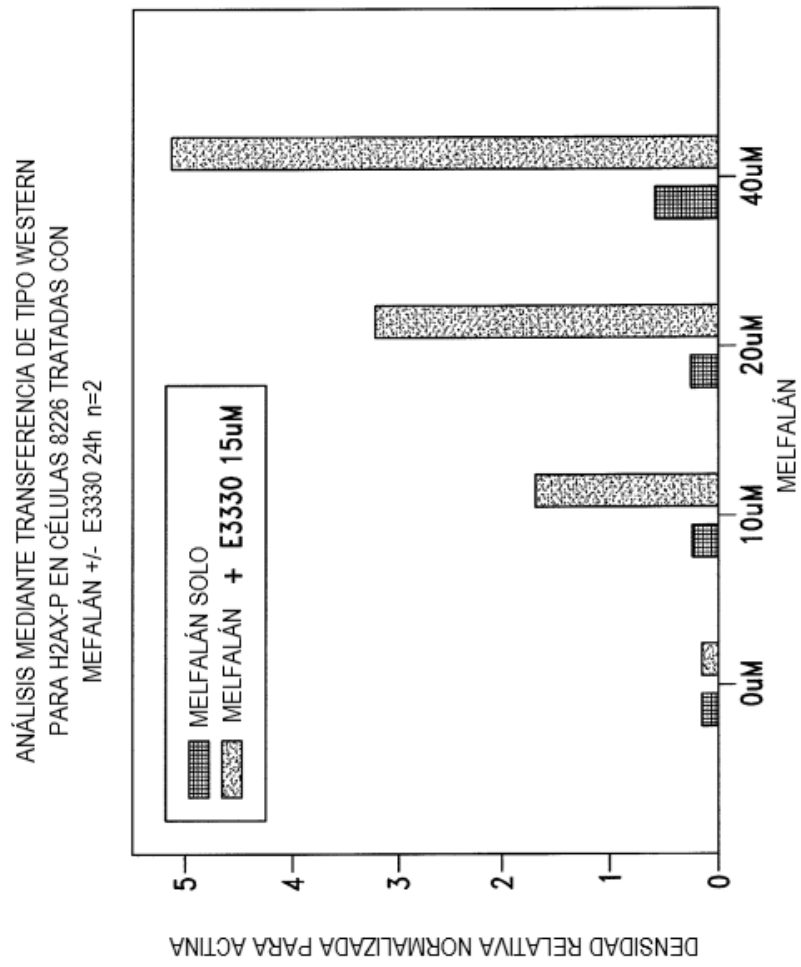


Fig 14D

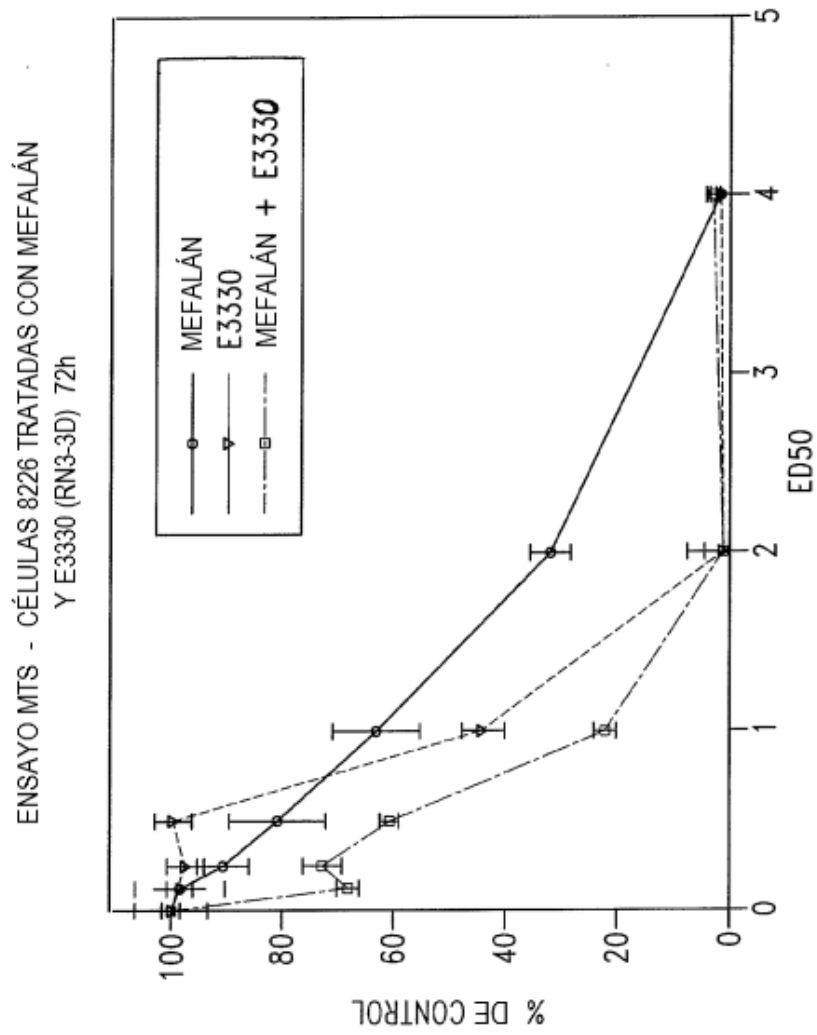


Fig 15

Células PaCa -2 tratadas con E3330 + Gem (0,25 μ M) durante 24 h,
después se cambian los medios y ensayan para apoptosis a 24 y 48 h
3/22/07

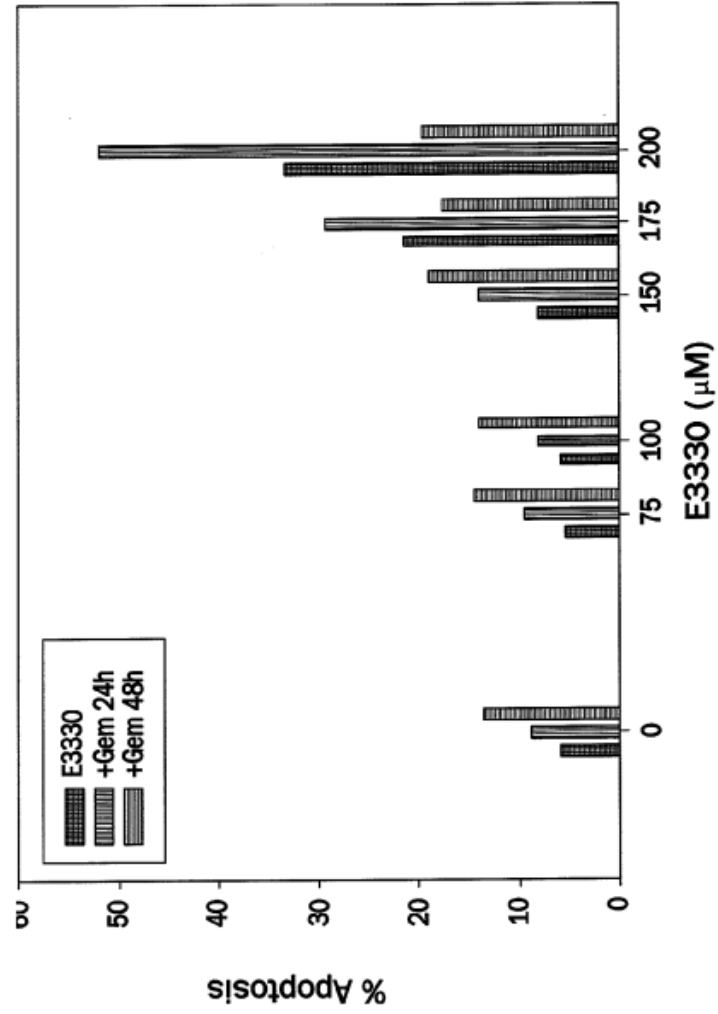


Fig. 16

Respuesta de la dosis y tiempo de las células DRG a E3330 (RN3-3G)

Ensayo de MTS 052307

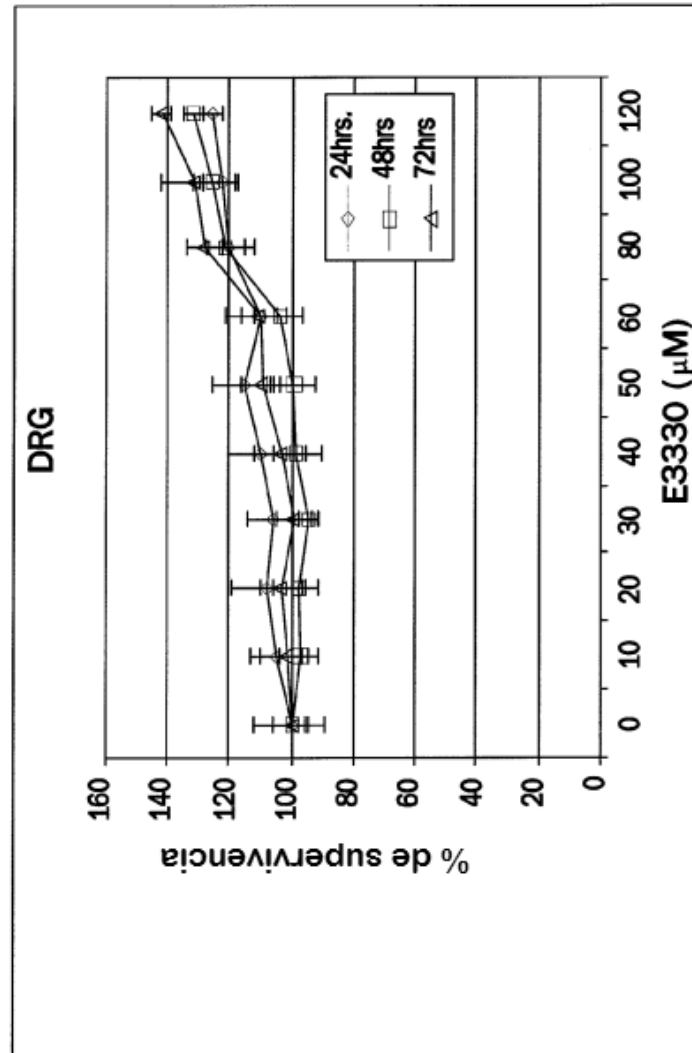
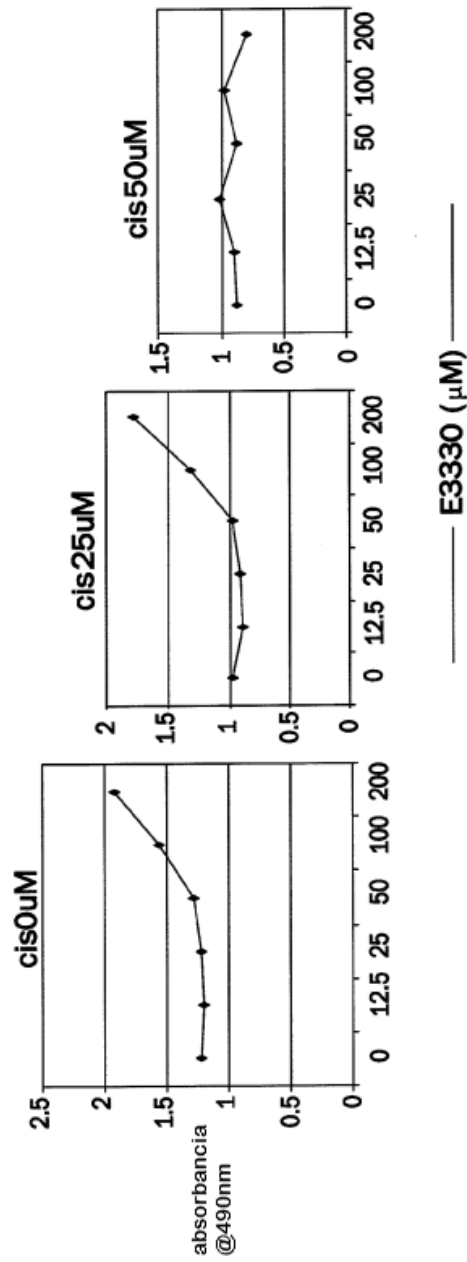


Fig. 17

**Células DRG se trataron con E3330 (RN3-3b) +/- cisplatino
mediante el ensayo de MTS**

48 horas



Ninguna destrucción celular significativa puede verse después del tratamiento con E3330

Fig. 18

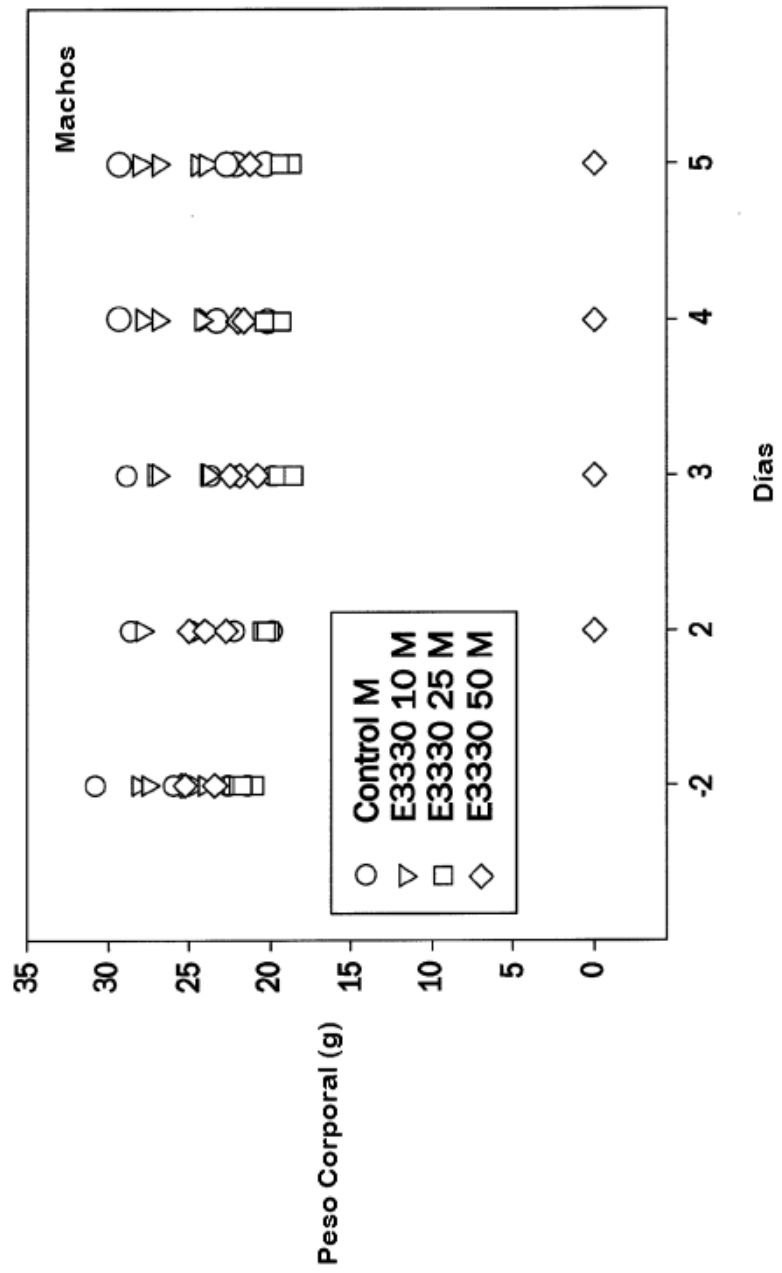


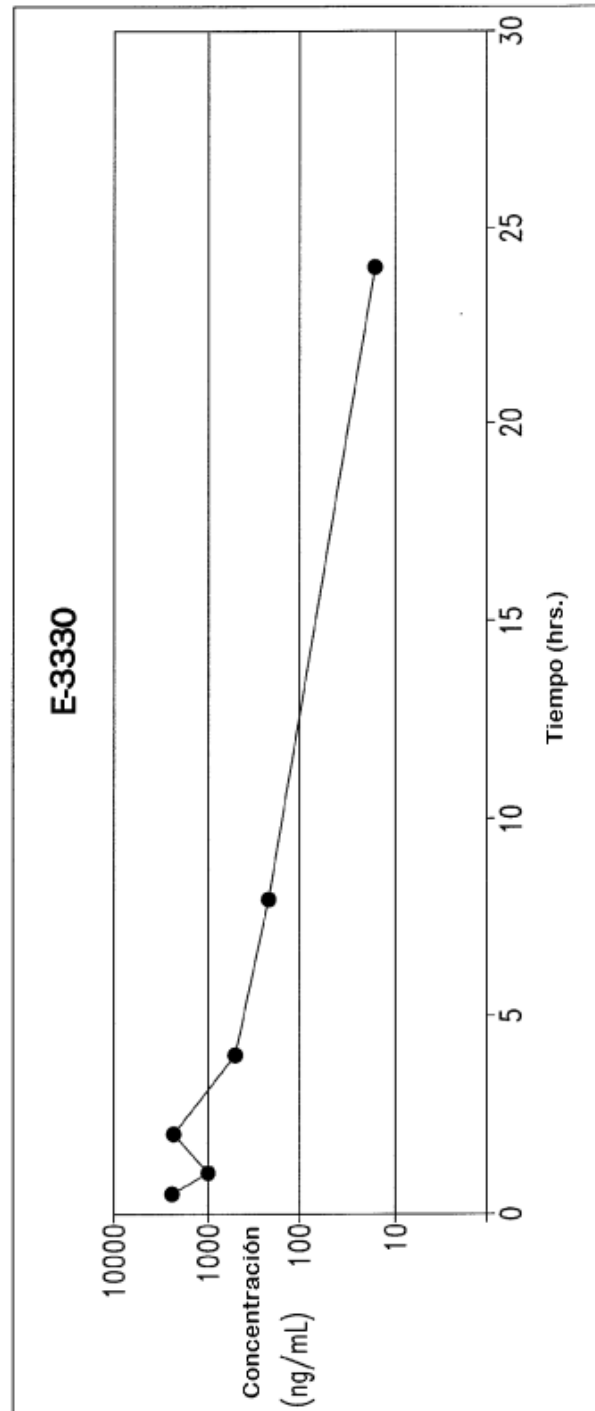
Fig. 19

Supervivencia									
Dosis de E3330			Día 2	Día 3	Día 4	Día 5			
mg/kg			19 Sep	20-Sep	21-Sep	22-Sep			
0	hembra		4/4	4/4	4/4	4/4			
	macho		4/4	4/4	4/4	4/4			
10	hembra		4/4	4/4	4/4	4/4			
	macho		4/4	4/4	4/4	4/4			
25	hembra		4/4	3/4	3/4	3/4			
	macho		4/4	4/4	4/4	4/4			
50	hembra		4/4	4/4	1/4	3/4			
	macho		3/4	2/4	2/4	1/4			
100	hembra		0/6	N/A	N/A	N/A			
	macho		0/1						

Fig. 20

E-3330										
Ratón	Tpo (hrs)	E-3330	BMC	Relac Área	Estimado	Curva Estándar	µM	Caja #	Marca Cola	ID Muestra
ID muestra			Área Pico	Área Pico	Conc. (ng/mL)	Interv.				
2	0,5	1970000	41300	47,6998	2200	0-10000	5,8	371529	1	2
7	1	1230000	52000	23,6538	954		2,5	371529	1111	7
12	2	1010000	21400	47,1963	2174		5,7	371528	111	12
17	4	806000	52100	15,4702	476	0-3000	1,3	371529	1	17
22	8	73500	11100	6,6216	209		0,6	371529	1111	22
27	24	18800	27300	0,6886	16	0-30	0,041	371528	111	27

Fig. 21A

**Fig. 21B**

Grupo	lambda (hr ⁻¹)	t _{1/2} (hr)	Dosificación (mg)	Peso (kg)	AUC 0-infinito (hr*ng/mL)	Cl/F		
Todos Ratones	0,198	3,5	0,5181	0,0207	3789	mL/hr	L/hr	mL/min
Hembra	0,1988	3,5	0,483	0,0193	5691	84,86	0,085	1,4
Macho	0,1919	3,6	0,578	0,0231	941	614,27	0,614	10,2
Definición de Términos								
t _{1/2} es tpo de vida media								
Cl/F es el aclaramiento sanguíneo dividido por la biodisponibilidad del fármaco								

Fig. 22

Citofilamentos E3330 RA en el Día 6

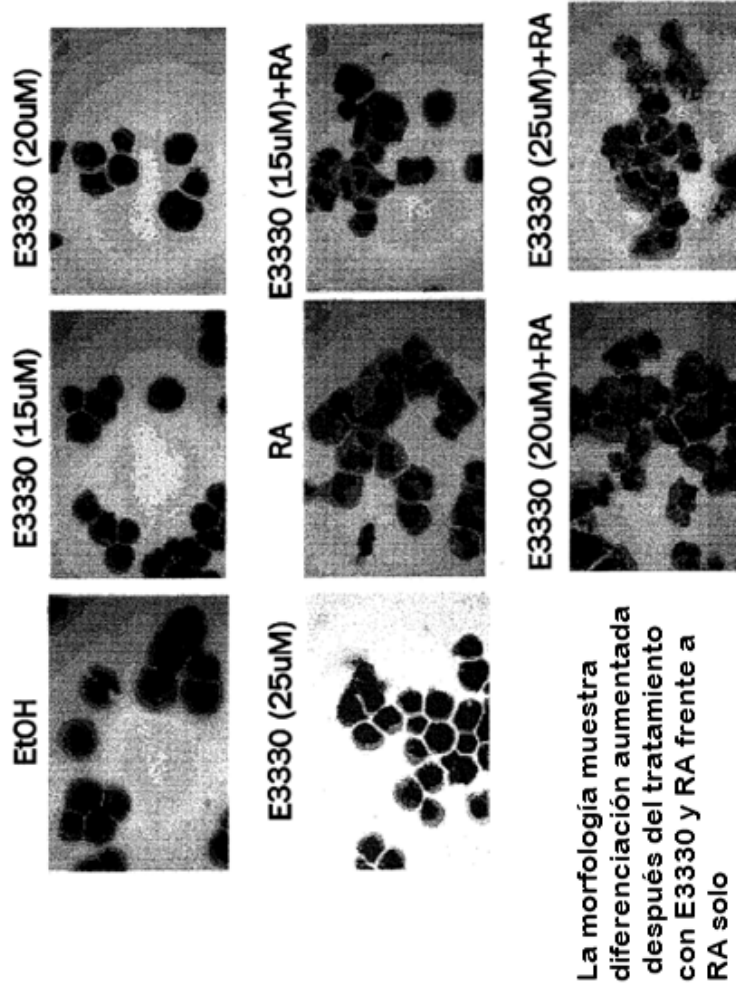


Fig. 23

Porciento de apoptosis con anexina Día 6

exp#0307

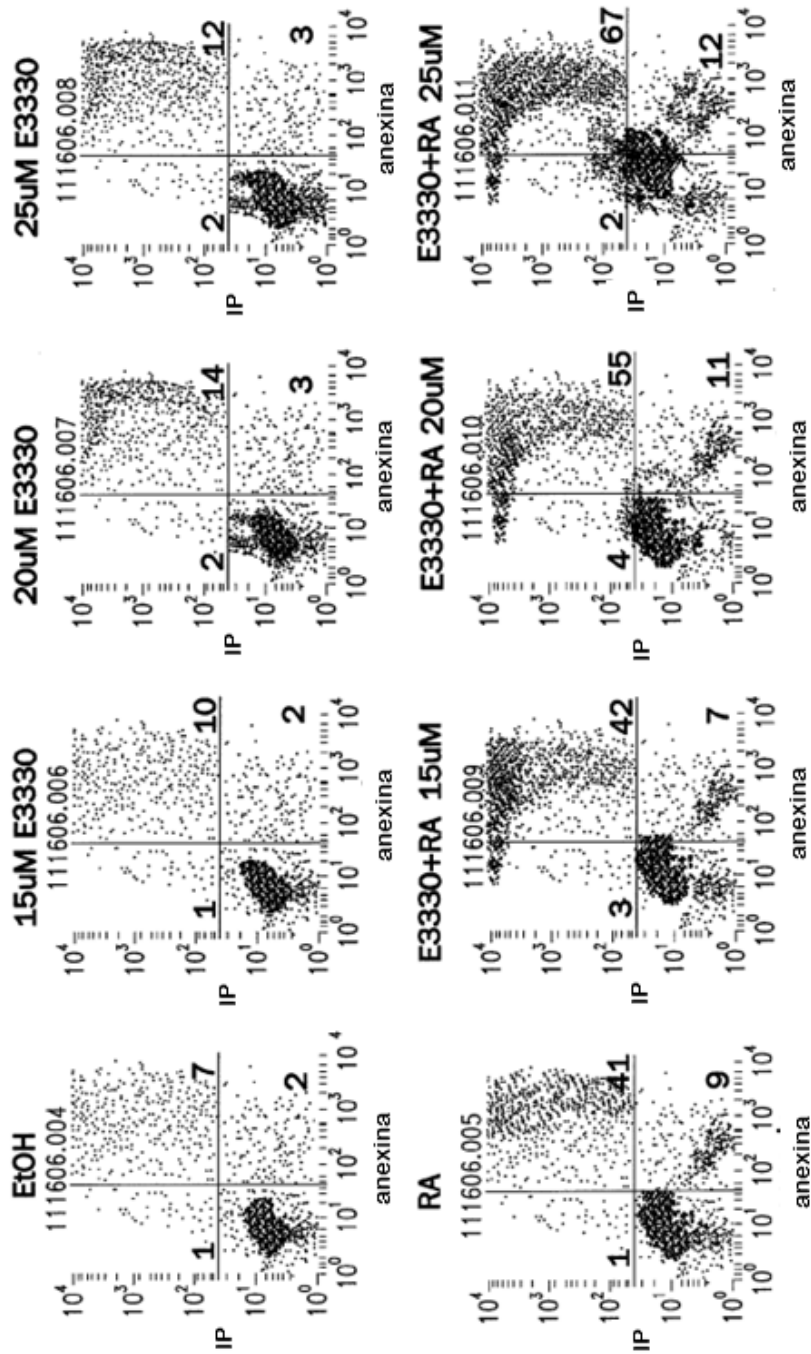


Fig. 24

EC3330 se mantiene constante y RA dosificaciones variables

CÉLULAS	CD11 EXP	03607 día 4	día 6
HL60 EtOH TIPO SILVESTRE		7	4
E3330 25uM		11	13
10-5M RA		140	185
10-5M RA+ E3330 25uM		280	390
10-6M RA		150	223
10-6M RA+ E3330 25uM		246	409
10-7M RA		140	212
10-7M RA+ E3330 25uM		147	309
10-8M RA		100	124
10-8M RA+ E3330 25uM		130	248
10-9M RA		35	21
10-9M RA+ E3330 25uM		31	35

RA+E3330 rinde aproximadamente un aumento de 2 veces en la diferenciación celular en comparación con la misma concentración de RA solo. Se puede alcanzar la misma cantidad de diferenciación con dosis 1000 veces inferiores. (Comparar los números para 10-5M RA y 10-8M RA+ E3330 25uM)

Fig. 25

CÉLULAS	ANEXINA : (UR+LR)		
	Exp	día 4	día 6
HL60 EtOH TIPO SILVESTRE	03607	4	4
E3330 25 uM		7	15
10-5M RA		15	37
10-5M RA + E3330 25 uM		28	66
10-6M RA		15	36
10-6M RA + E3330 25 uM		18	50
10-7M RA		15	27
10-7M RA + E3330 25 uM		14	34
10-8M RA		14	20
10-8M RA + E3330 25 uM		15	31
10-9M RA		7	10
10-9M RA + E3330 25 uM		11	27

Fig. 26

E3330 y Metoxiamina

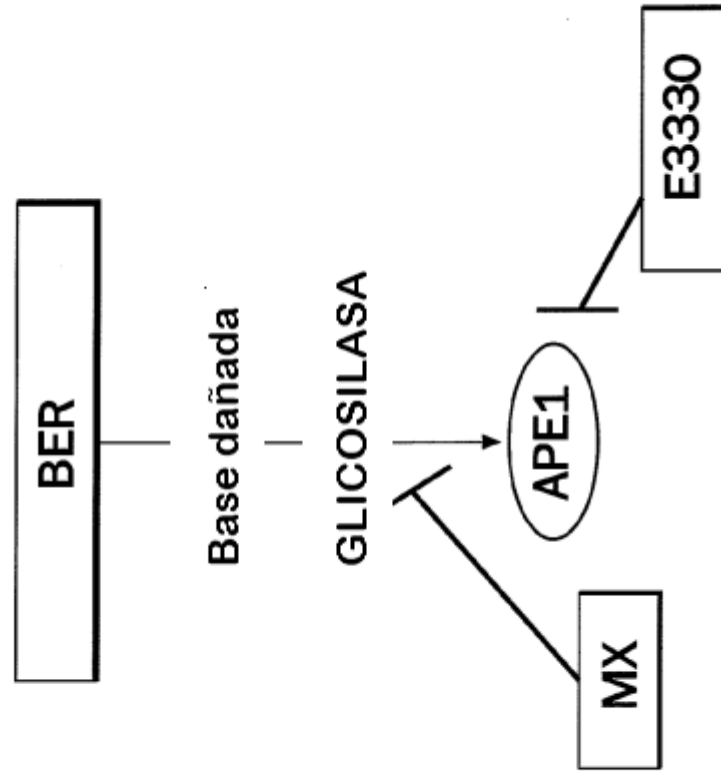


Fig. 27A

Ensayo de MTS- células 8226 tratadas c/ E3330 +/- MX 72h
n=4

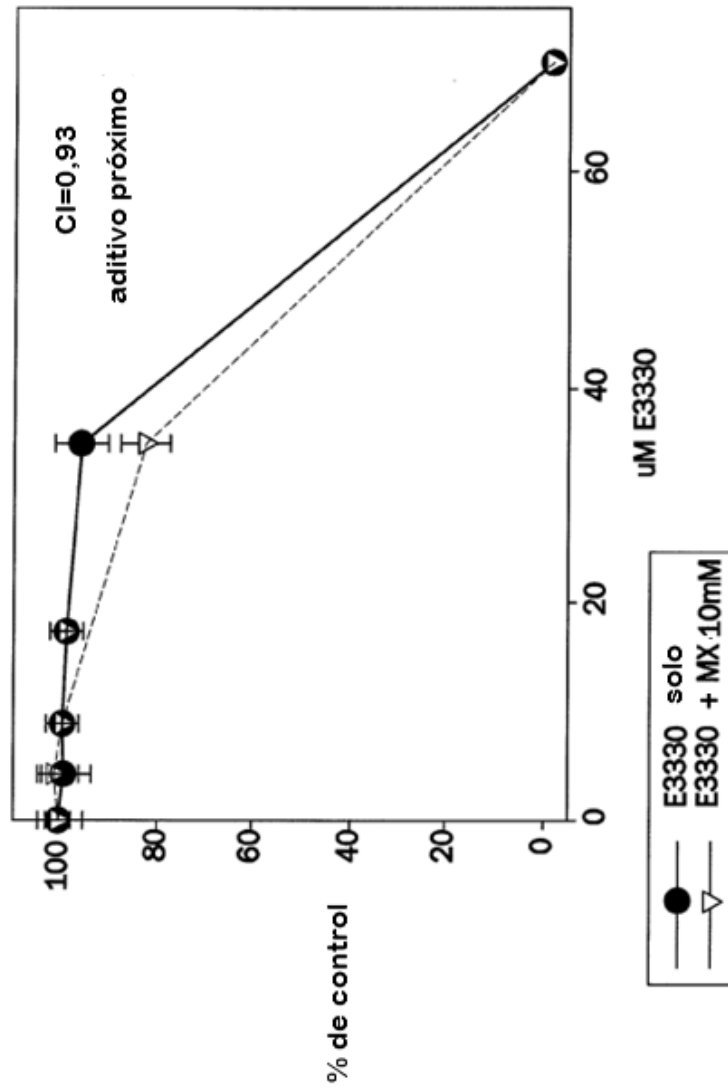


Fig. 27B

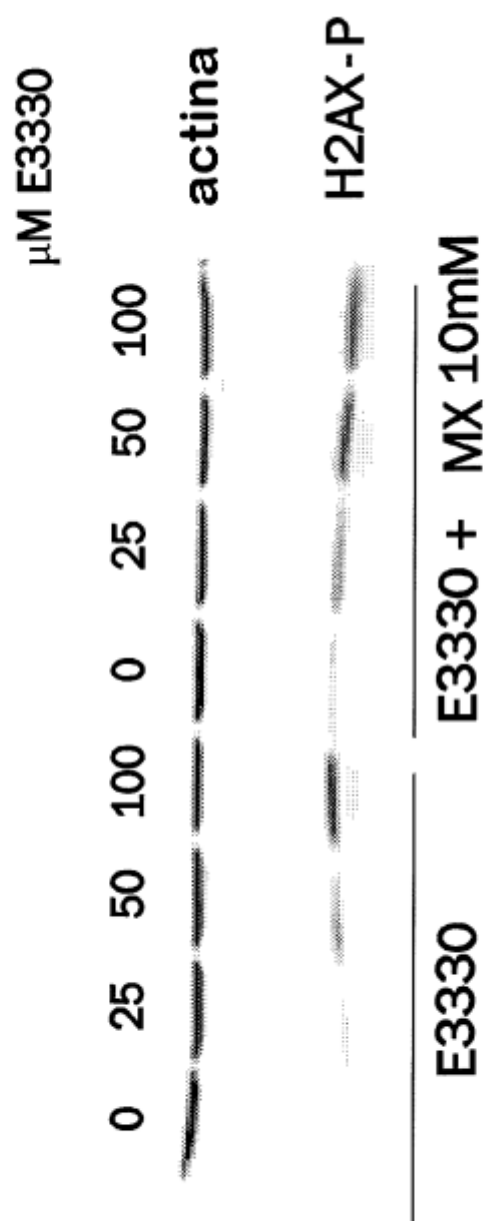


Fig. 27C

Análisis de transferencia por western para H2AX-P en las células 8226 tratadas con E3330 +/- MX 24h n=2

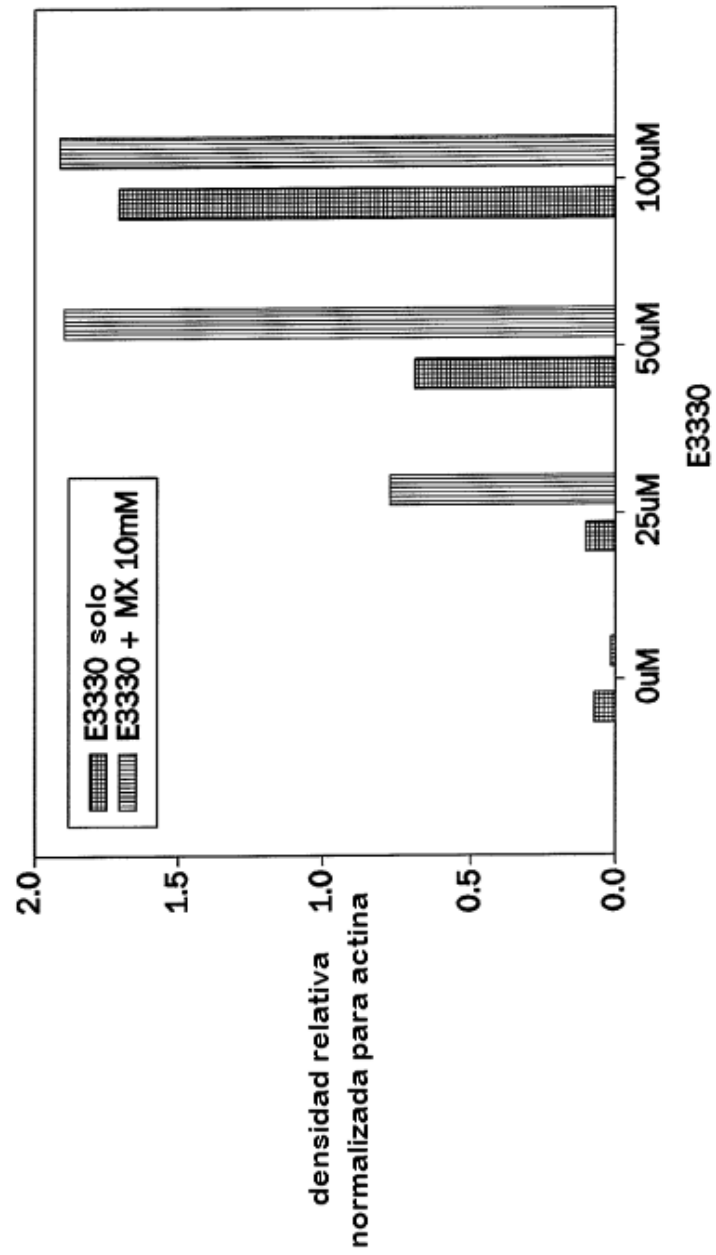


Fig. 27D