

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 990**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4995 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013** **PCT/US2013/032523**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014** **WO14035484**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013** **E 13832341 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 2890382**

54 Título: **Composición y métodos para la inhibición de la actividad de complejo de factor de transcripción inducible por hipoxia y su utilización para el tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

29.08.2012 US 201261694717 P

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

22.02.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA
(100.0%)**

**USC Stevens 1150 South Olive Street, Suite 2300
Los Angeles, California 90015, US**

72 Inventor/es:

**OLENYUK, BOGDAN, Z.;
DUBEY, RAMIN y
LEVIN, MICHAEL, D.**

74 Agente/Representante:

LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen

ES 2 655 990 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

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE COMPLEJO DE FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLE POR HIPOXIA Y SU UTILIZACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a compuestos de epiditiodiquetopiperazina, composiciones farmacéuticas basadas en los mismos y a métodos para tratar, reducir o inhibir la transcripción y traducción de genes inducibles por hipoxia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La alta tasa de morbilidad y mortalidad por cáncer sigue siendo una preocupación importante entre la población de las sociedades occidentales. Además de tener un impacto en los pacientes con cáncer y en los miembros más próximos de sus familias, el cáncer inflige una gran carga a la sociedad. El costo del tratamiento del cáncer y la atención del paciente suele ser alto y contribuye al aumento del costo del seguro médico y los resultados, a su vez, en un mayor porcentaje de personas sin seguro y, en consecuencia, en una mayor carga económica cuando las personas no aseguradas enferman o sufren trastornos. El cáncer también causa un impacto negativo significativo en las empresas debido a las ausencias prolongadas del trabajo de los pacientes con cáncer.

20 Aunque los métodos de tratamiento del cáncer han mejorado enormemente con el paso de los años, muchos desafíos continúan vigentes, sobre todo las recaídas entre pacientes con cáncer y las dificultades para tratar pacientes en estadios avanzados de cáncer así como con enfermedades metastásicas o con cánceres sistémicos como leucemia o linfoma. Por ejemplo, los métodos de diagnóstico mejorados combinados con mejores técnicas quirúrgicas permiten a los oncólogos eliminar el tumor con mayor confianza, mientras que al mismo tiempo minimizan la eliminación del tejido normal. Como tal, el tiempo de recuperación para los pacientes puede reducirse y el impacto psicológico se reduce. Sin embargo, la cirugía es solo una de las pocas herramientas útiles para tratar a pacientes con tumores localizados no metastásicos o tumores que están mínimamente diseminados.

30 La quimioterapia es otro tratamiento de elección para ciertos tipos de cáncer. Sin embargo, los métodos quimioterapéuticos generalmente no son específicos para las células tumorales en comparación con las células normales. Como resultado, la quimioterapia generalmente se asocia con efectos secundarios graves y puede ser particularmente devastadora para el sistema inmunitario del paciente y para los tejidos que se dividen rápidamente, como los tejidos del hígado, los riñones, el intestino y el epitelio.

35 La progresión del cáncer depende de la angiogénesis o del surgimiento de nuevos vasos sanguíneos que penetran en todos los tumores sólidos. La rápida proliferación de tejido que define el cáncer da como resultado una serie de respuestas celulares adaptativas, entre las cuales se encuentran los procesos diferenciados pero relacionados de la angiogénesis y el aumento de la glicólisis. La angiogénesis es impulsada principalmente por varios factores mitogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores juegan un papel clave. Si bien la neovascularización es esencial en el desarrollo embrionario, es altamente indeseable en los cánceres dado que estos vasos nacientes infunden tejido tumoral y les proporcionan una mayor oxigenación y contenido de nutrientes para un crecimiento más rápido. La angiogénesis es particularmente perniciosa porque presenta una doble amenaza: no solo acelera el crecimiento tumoral, sino que también proporciona una puerta de entrada a la metástasis a través de la vasculatura recién formada. Dado que es el crecimiento metastásico el que ejerce el mayor impacto en la supervivencia general del paciente, la angiogénesis representa un objetivo quimioterapéutico crítico. Además, los objetivos vasculares no deben generar resistencia a la terapia dado que no están sujetos a las mutaciones múltiples que ocurren en las células malignas. Una de las principales ventajas de atacar el suministro de sangre (vasculatura) es que, a diferencia de las células en los tejidos cancerosos, las células que comprenden los vasos sanguíneos son genéticamente estables y, por lo tanto, deberían tener una resistencia reducida a la terapia.

50 A medida que las células tumorales continúan proliferando, se ven obligadas a alejarse del suministro de sangre que transporta el oxígeno y los nutrientes necesarios para los procesos metabólicos y, por lo tanto, no pueden lograr una perfusión de oxígeno adecuada. La consiguiente hipoxia ¹ da como resultado un cambio a un metabolismo anaeróbico que selecciona células con glicólisis regulada positivamente ². La función glicolítica mejorada lleva a una mayor generación de ácido láctico que disminuye el pH intracelular y puede facilitar la degradación de la matriz extracelular y la membrana basal, promoviendo de este modo

la angiogénesis ³. La glicólisis confiere una ventaja significativa para superar restricciones de crecimiento durante la tumorigénesis ^{4,5} y la mayoría de los tumores metastásicos primarios muestran una regulación positiva significativa de las enzimas glicolíticas como las hexocinasas 1 y 2 y los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 ⁶.

- 5 La hipoxia es una de las características más importantes de los tumores sólidos que desempeña un papel vital en la proliferación, la señalización y el crecimiento celular. ⁷ Una neoplasia habitual generalmente está desprovista de vasos sanguíneos en su etapa inicial. Las células que proliferan rápidamente contribuyen al desarrollo de la hipoxia ⁸. A pesar del hecho de que la proliferación celular disminuye en aquellas partes de un tumor que están lejos de los vasos sanguíneos ⁹, tienden a seleccionar fenotipos celulares más agresivos. Además, se ha informado que el tejido hipóxico alejado de los vasos sanguíneos da lugar a células que han perdido la sensibilidad a la apoptosis mediada por p53 ⁷.

- 10 La hipoxia también lleva a una regulación positiva de los genes implicados en la resistencia a los fármacos, como las glucoproteínas P ^{10, 11}, además del hecho de que la falta de suministro adecuado de sangre a las células hipóxicas dificulta gravemente la administración de fármacos a estas células. ^{12, 13} Lo más importante es que, desde un punto de vista transcripcional, la hipoxia da como resultado una regulación positiva de los genes implicados en la angiogénesis ¹⁴ y la invasión tumoral ¹⁵, lo que da como resultado un fenotipo de cáncer más agresivo. ¹⁶

- 20 En células y tejidos, la respuesta a la hipoxia está mediada principalmente por la familia de factores de transcripción inducibles por la hipoxia, entre los cuales el factor 1 inducible por la hipoxia (HIF1) juega un papel importante. Es un factor de transcripción heterodimérico que media la regulación de muchos genes clave regulados positivamente en un estado hipóxico (Figura 1a). ¹⁷ Durante condiciones normóxicas, la subunidad de HIF1 está regulada por hidroxilación en los residuos de prolina 402 y 564; ¹⁸ estas modificaciones sirven como un sitio de acoplamiento para la proteína von Hippel-Lindau (pVHL) ¹⁹ para unir HIF1 y etiquetarlo con ubiquitina para la posterior degradación proteasomal. ²⁰ Sin embargo, en condiciones hipóxicas, el HIF1 α se acumula, ingresa en el núcleo y se dimeriza con su subunidad beta, el translocador nuclear del receptor de hidrocarburo arilo (ARNT o HIF1 β) ²¹. Se une a la región promotora de genes inducibles por hipoxia que poseen elementos de respuesta a la hipoxia (HRE), ²² incluyendo VEGF, c-Met, EPO y GLUT-1 ²³⁻²⁴. Debido a que los niveles bajos de oxígeno también impiden la hidroxilación de otro sitio regulador en Asn803, ^{25 - 30} la proteína de unión CREB coactivadora (CBP)/p300 ³¹⁻³³ se recluta mediante la unión del dominio C-terminal de HIF1 α y promueve niveles elevados de expresión de genes inducibles por hipoxia (Figura 1b). ^{34 - 36} En muchas células tumorales en las que se encuentran mutaciones oncogénicas en RAS, SRC y HER2/NEU/ERBB2, se han detectado altos niveles de HIF1 α incluso en condiciones bien oxigenadas. ³⁷

- 35 Se ha demostrado que la construcción antisentido de HIF1 α erradica *in vivo* un pequeño linfoma tímico trasplantado e incluso aumenta la eficacia de la inmunoterapia contra tumores más grandes. ³⁸ Los inhibidores de moléculas pequeñas de microtúbulos, como el 2-metoxiestradiol, la vincristina y el paclitaxel, reducen los niveles de HIF1 α *in vitro* y también reducen el crecimiento y la vascularización del tumor. ³⁹ Sin embargo, no se entiende claramente si los efectos que se muestran en la reducción del crecimiento tumoral se deben a la inhibición de microtúbulos o a la reducción de los niveles de HIF1 α .

- 40 HIF1 interactúa principalmente con el dominio CH1 de CBP/300 a través de una serie de residuos clave de cisteína y esta interacción es impulsada por fuerzas hidrofóbicas. Se demostró que el producto natural quetomina (Figura 2, ver más abajo), un metabolito fúngico de *Chaetomium sp.*, demostró una inhibición potente y específica del complejo HIF/p300. Debido a que p300/CBP es absolutamente necesario para la transactivación mediada por HIF1, el bloqueo de la asociación de HIF1 y p300/CBP regula de manera efectiva a la baja la transcripción.

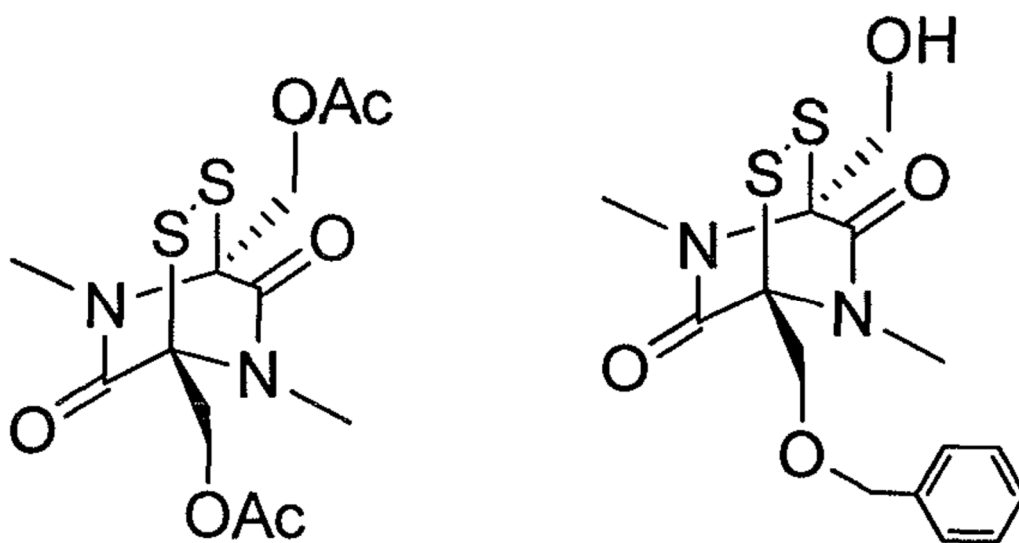
Block et al. (Block, KM et al. (2009), JACS, vol. 131, nº 50, páginas 18078-18088) describe un compuesto de epiditioquetopiperazina para su utilización en la reducción o inhibición de la transcripción o traducción de genes inducibles por hipoxia.

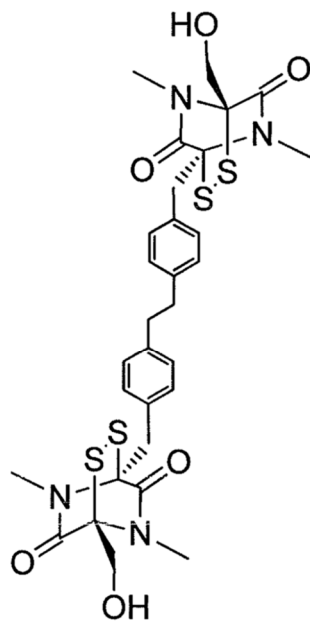
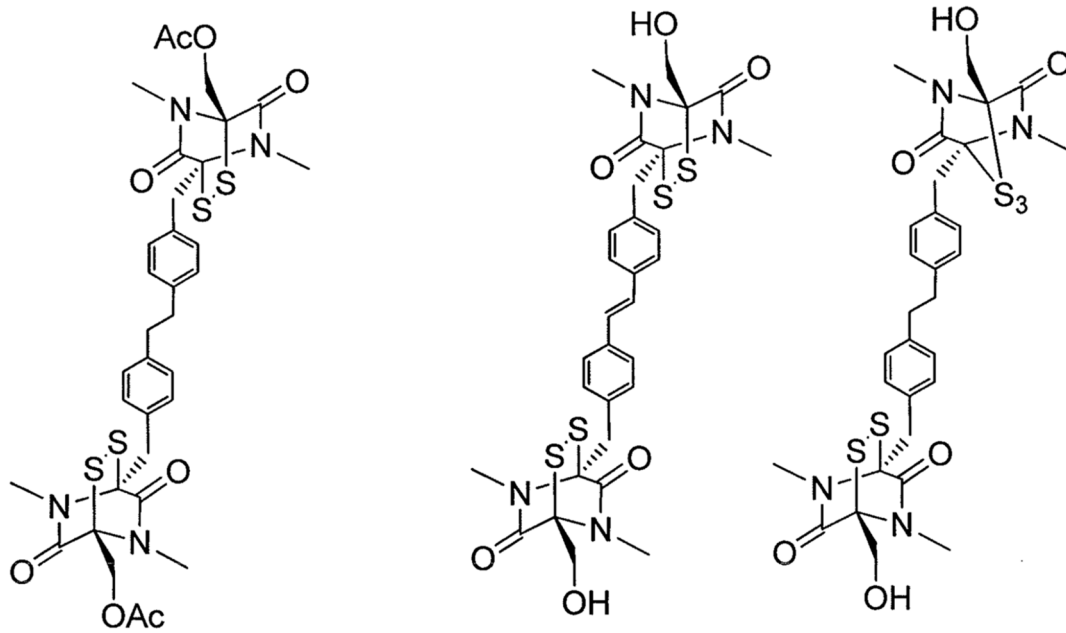
RESUMEN DE LA INVENCION

- 50 Una forma de realización de la presente invención se dirige a compuestos de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

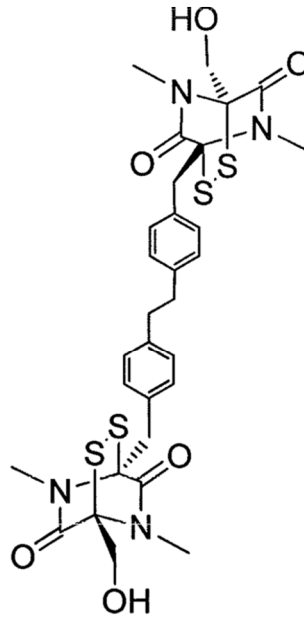
Otra forma de realización de la presente invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, disuelto o dispersado en un vehículo.

Otra forma de invención de la presente invención se dirige a los compuestos siguientes:





(±)-LS72



meso-LS72

Otra forma de realización de la presente invención se dirige a un método *ex vivo* para interferir con la trayectoria transcripcional inducida por hipoxia. En general, el método de acuerdo con esta forma de realización comprende hacer contactar una célula con al menos un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Otra forma de realización de la presente invención se dirige a un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas para su utilización en un método para tratar el cáncer de mama que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de al menos un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Otra forma de realización de la presente invención se dirige a un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas para el tratamiento de carcinoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de al menos un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos adjuntos y las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 Figura 1 (a) Estructura del complejo HIF1 α C-TAD/p300 CHI, mapa de dominio del factor 1 α inducible por hipoxia (HIF1 α) y secuencia del HIF1 α C-TAD humano. (b) Ilustración esquemática de la vía transcripcional HIF1 α .
- Figura 2 Quetocina CTC, aislada de *Chaetomium globosum* y quetomina CTM, de *Chaetomium cocliodes*.
- 10 Figura 3 Estructuras de epiditiodioeptiperazinas sintéticas LS69, LS72 y dicetopiperazina de control NP481.
- La Figura 4 muestra la síntesis de tioacetales bicíclicos y ETP de anillo único en las siguientes condiciones: a: p-Anisaldehído, BF₃, ET₂O, DCM, RT, 16h, 92%; b: mCPBA, Me₂S, HClO₄; c: BOMCl, nBuLi, THF, -78°C, d: BCL₃, CH₂Cl₂; e: AcCl, piridina, CH₂Cl₂; f nBuLi, THF, -78°C, BnCl.
- 15 La Figura 5 muestra la síntesis de ETP puenteados bajo las siguientes condiciones: a: 7, nBuLi, THF, -78°C; b: BCl₃, CH₂Cl₂; c: mCPBA; Me₂S, HClO₄; d: nBuLi, THF, -78°C.
- Figura 6 Datos SPR para la unión directa de LS69 con la proteína de fusión inmovilizada GST-CH1-p300. Se obtuvo una constante de unión de 1.09 μ M,
- Figura 7 Sensorgramas SPR que muestran la unión de LS72 a GST-CH1-p300 inmovilizado. Se obtuvo una constante de unión de 3.62 μ M.
- 20 Figura 8 Análisis de la actividad del promotor inducible por hipoxia con ensayos de luciferasa en la línea celular MDA-MB-231 transfectada de manera estable con el plásmido hRE-hCMV-Luc. Las concentraciones de los compuestos LS69, LS72 y NP481 fueron de 200 nM y 600 nM, respectivamente.
- 25 Figura 9 Niveles relativos de ARNm del gen VEGF en células MCF7 medidos por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Las concentraciones de los compuestos LS69, LS72 y NP481 son 200 nM y 600 nM, respectivamente.
- 30 Figura 10 Ensayo de citotoxicidad de MTT para LS72 en células MCF7. Las células se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS. Las células se trataron con diferentes concentraciones de LS72 durante 24 horas y la cantidad de formazano púrpura formado se determinó mediante espectrofotometría.
- 35 Figura 11 Datos de ensayo de citotoxicidad de MTT para quetomina en la línea celular A549. Las células se trataron con diferentes concentraciones de compuesto durante 48 horas en medio F-12K sin suero. El valor de EC50 obtenido para quetomina fue de 0.9 μ M en la línea celular A549 después del tratamiento durante 48 horas. Para comparación, el tratamiento de la línea celular MCF7 durante 24 horas con quetomina dio EC50 de 0.2 μ M, indicando una citotoxicidad significativamente mayor del compuesto en esa línea celular.
- 40 Figura 12 Datos de ensayo de citotoxicidad de MTT para LS72 en la línea celular A549. Las células se trataron con diferentes concentraciones de compuesto durante 48 horas en medio F-12K sin suero.
- 45 Figura 13 Niveles de ARNm de tres genes inducibles por HIF1 α : VEGF, c-Met y Glut1 en células A549 después del tratamiento con LS72. Datos de experimentos de qRT-PCR que muestran los niveles de ARNm de tres genes inducibles por HIF1 α , VEGF, c-Met y Glut1 en A549 después del tratamiento de las células en un medio con suero al 0.2% con LS72 (400 nM). La hipoxia se indujo 300 μ M por DFO. Las barras de error son $\pm$ s.e.m para los experimentos realizados por cuadruplicado. Las barras de error son $\pm$ s.e.m. de experimentos realizados por triplicado. *** P <0.001, ** P <0.01, prueba t.

Figura 14 (A) datos de qRT-PCR para los genes LOST y (B) CXCR4 en células A549 tratadas con LS72. La hipoxia fue inducida por una bolsa de hipoxia. Las células se mantuvieron en medio F-12K con suero al 2%. Después de alcanzar el 65% de confluencia, las células se cultivaron en medio libre de suero y se trataron con LS72 (400 nM). La hipoxia se indujo con DFO (300 μ M) durante 48 h. Las barras de error son $\pm$ s.e.m. de experimentos realizados por triplicado. ** P <0.01, prueba t.

Figura 15 Niveles de ARNm para VEGF en la línea celular A549, que ilustra la respuesta a la dosis del tratamiento con LS72 a tres concentraciones diferentes. Los ensayos de qRT-PCR se realizaron para determinar los niveles de ARNm para VEGF en la línea celular A549 tratada con LS72 a concentraciones: 100 nM, 400 nM, 1600 nM. La hipoxia fue inducida por DFO (300 μ M). Las barras de error son $\pm$ sem para los experimentos realizados por triplicado. Las barras de error son $\pm$ s.e.m. de experimentos realizados por triplicado. ** P <0.01, * P <0.05, prueba t.

Figura 16 Niveles de ARNm para c-Met en la línea celular A549 que muestran la respuesta a la dosis de LS72 a concentraciones de 100 nM, 400 nM, 1600 nM. Se utilizó qRT-PCR para determinar los niveles de ARNm de c-Met se indujo Hipoxia con DFO (300 μ M). Las barras de error son $\pm$ sem para los experimentos realizados por triplicado. Las barras de error son $\pm$ s.e.m. de experimentos realizados por triplicado. *** P <0.001, ** P <0.01, # P <0.1, prueba t.

Figura 17 Datos de qRT-PCR para Glut1 mRNA en 85% de células A549 confluentes tratadas con LS72 en tres concentraciones diferentes. Se realizaron ensayos de qRT-PCR para determinar los niveles de ARNm para Glut1 en la línea celular A549 tratada con LS72 a concentraciones: 100 nM, 400 nM, 1600 nM. La hipoxia se indujo con DFO (300 μ M). Las barras de error son $\pm$ sem para los experimentos realizados por triplicado. Las barras de error son $\pm$ s.e.m. de experimentos realizados por triplicado. *** P <0.001, ** P <0.01, prueba t.

Figura 18 datos qRT-PCR para células A549 donde se indujo hipoxia en células confluentes al 85%. Se observó una inducción de más de 650 veces de la transcripción de CXCR4 con DFO a una concentración de 300 μ M. LS72 a dos concentraciones diferentes de 400 nM y 1600 nM reguló a la baja los niveles de ARNm de CXCR4 de una manera dependiente de la dosis. Las barras de error son $\pm$ sem para los experimentos realizados por triplicado. Las barras de error son $\pm$ s.e.m. de experimentos realizados por triplicado. ** P <0.01, # P <0.1, prueba t.

Figura 19 Niveles de proteína VEGF y c-Met regulados negativamente por LS72. a) Las células MCF7 se trataron con quetomina (200 nM), LS72 (400 nM) y LS75 (400 nM), se indujo HIF1 α con 300 μ M DFO. Las transferencias de Western se realizaron por triplicado y los gráficos de barras para los niveles de proteína muestran una regulación a la baja significativa de la proteína VEGF con LS72. b) Las células MDA-MB-231 se trataron con quetomina (200 nM), LS72 (400 nM) y LS75 (400 nM). HIF1 α fue inducido con 150 μ M de CoCl₂. Las transferencias de Western se realizaron por triplicado y los gráficos de barras para los niveles de proteína muestran que tanto la quetomina como LS72 regulan a la baja significativamente los niveles de proteína c-Met.

Figura 20 Resultados del análisis de datos de micromatrices. El diagrama de Venn verde muestra genes que se regulan a la baja en el vehículo (círculo verde izquierdo), es decir, genes que están se regulan a la baja en la hipoxia del vehículo en comparación con normoxia del vehículo y el círculo verde derecho muestra el número de genes inhibidos (> 2.0 veces) en la hipoxia tratados con LS72 (400 nM) en comparación con los genes en normoxia tratados con LS72. El diagrama rojo muestra los genes que están regulados por incremento en las mismas condiciones que las explicadas para el diagrama de Venn verde. El diagrama azul muestra el efecto general de aumento o disminución de genes (> 2.0 veces) en las condiciones mencionadas anteriormente.

Figura 21 Análisis de micromatrices de células MCF7 tratadas con LS72 en inducción de hipoxia usando DFO (300 μ M). El análisis de agrupamiento se realizó para ver las tendencias similares en los genes entre diferentes condiciones. El análisis muestra que las células MCF7 bajo hipoxia y tratadas con LS72 (400 nM) muestran tendencias similares a las observadas en vehículos, lo que sugiere que LS72 trabaja para anular el efecto de la hipoxia en los niveles transcripcionales globales.

Figura 22 Imágenes de microscopía intravital del modelo de tumor subcutáneo murino de células N202 fluorescentes transfectadas de forma estable con la construcción H2B-GFP. Los ratones con tumores N202 H2B-GFP se inyectaron por vía intravenosa el día 0 con 1 mg/kg de compuesto LS72 seguido de inyecciones diarias de 2 mg/kg después del día 8 y se obtuvieron

imágenes durante 2 semanas. Imágenes de fluorescencia IVM de tumores tomadas en días indicados después del tratamiento.

5 Figura 23 Cambio en la intensidad de fluorescencia obtenida a partir de imágenes tumorales de IVM de ratones tratados con LS72 o sin este. Los gráficos muestran la diferencia cuantitativa entre los volúmenes del tumor tal como se muestra en las imágenes de IVM en la Figura 22. Ratón vehículo (-■-) y ratones tratados con LS72, # 1 (-▲-) y # 2 (-◆-).

Figura 24 Datos de densidad de células y de duplicación de población para células HeLa tratadas con quetomina CTM y ETP LS69 y LS72. Control: solo medio de cultivo celular, vehículo: DMSO al 0.1% en medio de cultivo celular,

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definición

15 A menos que se indique lo contrario en el presente documento, todos los términos utilizados en la presente memoria descriptiva tienen los significados que los términos deberían tener para los expertos en la técnica de la presente invención. Se dirige a los practicantes particularmente a los libros de texto actuales para las definiciones y los términos de la técnica. Debe entenderse, sin embargo, que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos, ya que estos pueden variar.

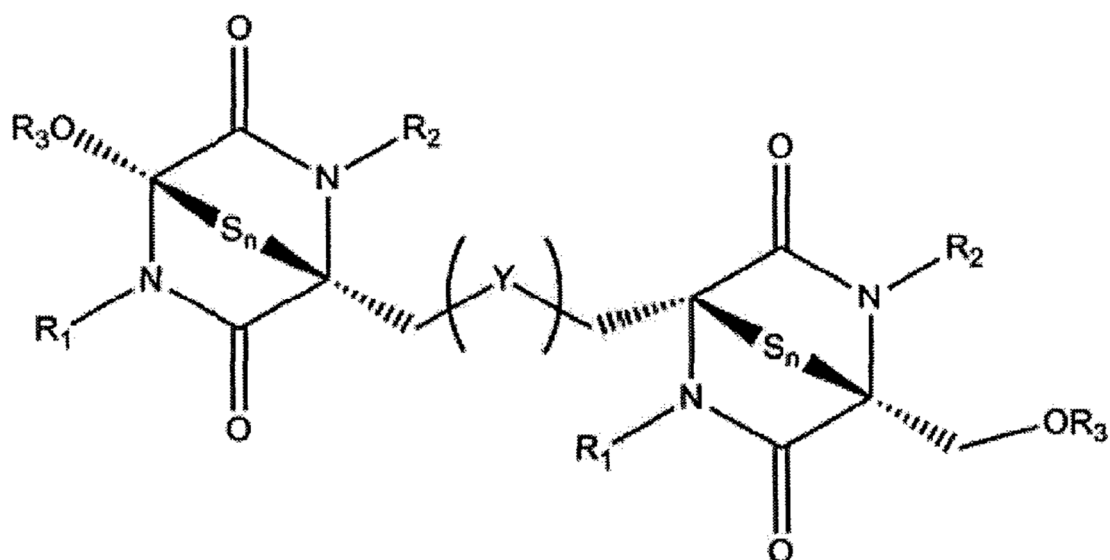
20 El término "alquilo" se refiere a un alquilo de cadena lineal o ramificada de C₁-C₁₀, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, i-pentilo, neo-pentilo, tert-pentilo, y similares. Los sustituyentes para un "alquilo sustituido" son hidroxilo, alcoxi (por ejemplo, metoxi y etoxi), mercapto, alquiltio (por ejemplo, metiltio), cicloalquilo (por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo), halógeno (por ejemplo, flúor, cloro, bromo y yodo), carboxi, alcóxicarbonilo (por ejemplo, metoxycarbonilo y etoxycarbonilo), nitro, ciano, haloalquilo (por ejemplo, trifluorometilo), alcohol, amino sustituido o no sustituido (por ejemplo, metilamino, dimetilamino y carbamoilamino), guanidino, fenilo, benciloxi, y similares. Estos sustituyentes son capaces de unirlos en una o más de las posiciones posibles.

25 El término "arilo" se refiere a un hidrocarburo aromático de anillo condensado o monocíclico. Los ejemplos del arilo son fenilo, naftilo y similares.

El término "heterociclo" se refiere a un grupo heterocíclico aromático que contiene uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre en el anillo y pueden estar condensados con un anillo carbocíclico u otro anillo heterocíclico en cualquier posición posible.

30 El término "acilo" se refiere a un sustituyente alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, arilcarbonilo, heterocicilcarbonilo o heteroarilcarbonilo, cualquiera de los cuales puede estar sustituido adicionalmente, por ejemplo, con uno o más sustituyentes. El término "halógeno", solo o en combinación, significa flúor, cloro, bromo o yodo y preferiblemente flúor, cloro o bromo.

35 En el presente documento también se describe un compuesto de acuerdo con la Fórmula I, que incluye sales, solvatos e hidratos de los mismos,



Fórmula I

en que $n = 1, 2, 3, 4$;

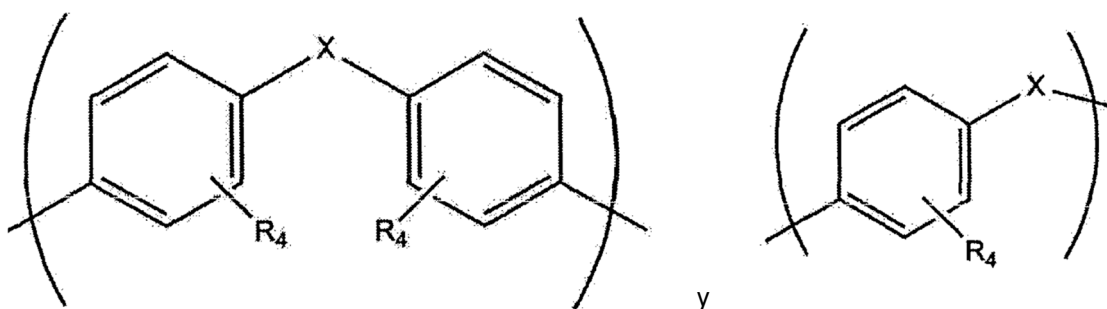
la distancia entre los centros de cada anillo de dicetopiperazina está entre 4 – 32 Angstroms;

5 la distancia preferida entre los centros de cada anillo de dicetopiperazina está entre 10 - 22 Angstroms;

R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido y arilo;

R_3 se selecciona del grupo que consiste en H y acilo;

10 Y se selecciona del grupo que consiste en $(CH_2)_k$, $(-CH_2-CH_2-O-)_l$, $(-CH_2-CH_2-NH-)_m$, $(-CH_2-CH_2-S-)_n$, $(-CH=CH-)_o$, heterociclo,

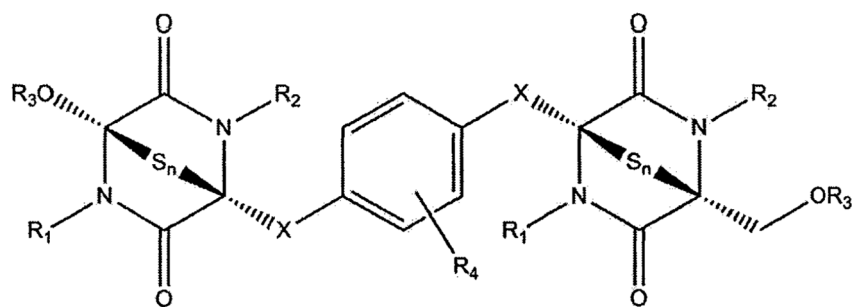


en que X se selecciona del grupo que consiste en $(CH_2)_k$, $(-CH_2-CH_2-O-)_l$, $(-CH_2-CH_2-NH-)_m$, $(-CH_2-CH_2-S-)_n$, $(-CH=CH-)_o$ y heterociclo, y en que k, l, m, n, o son cada uno independientemente 1, 2 o 3; y

R_4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno.

15 En el presente documento también se describe que, para R_1 y R_2 , el alquilo es preferiblemente metilo o etilo, el alquilo sustituido es preferiblemente $-CH_2OH$, y el arilo es preferiblemente fenilo o bencilo; para R_3 , el acilo es preferiblemente $COCH_3$.

En el presente documento también se describe un compuesto de acuerdo con la Fórmula II que incluye sales, solvatos e hidratos del mismo :



Formula II

en que $n = 1, 2, 3$;

5 R_1, R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido y arilo;

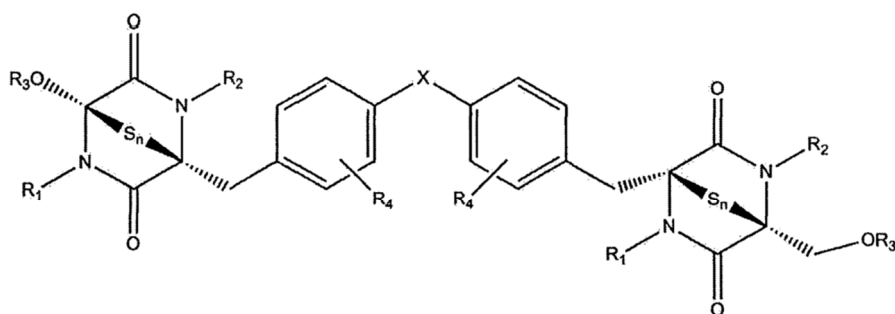
R_3 se selecciona del grupo que consiste en H y acilo;

X se selecciona independientemente del grupo que consiste en $(CH_2)_k$, $(-CH_2-CH_2-O-)_1$, $(-CH_2-CH_2-NH-)_m$, $(-CH_2-CH_2-S-)_n$, $(-CH=CH-)_o$ y heterociclo, en que k, l, m, n, o son cada uno independientemente igual a 1, 2 o 3; y

10 R_4 se selecciona independientemente entre H, alquilo y halógeno.

En el presente documento también se describe que, para R_1 y R_2 , el alquilo es preferiblemente metilo o etilo, el alquilo sustituido es preferiblemente $-CH_2OH$, y el arilo es preferiblemente fenilo o bencilo; para R_3 , el acilo es preferiblemente $COCH_3$.

15 En el presente documento también se describe un compuesto de acuerdo con la Fórmula III, que incluye sales, solvatos e hidratos de los mismos :



Formula

III

en que $n = 1, 2, 3$;

R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido y arilo;

$R_3 = H$ o acilo;

20 X = $(CH_2)_k$, $(-CH_2-CH_2-O-)_1$, $(-CH_2-CH_2-NH-)_m$, $(-CH_2-CH_2-S-)_n$, $(-CH=CH-)_o$ y heterociclo, en que k, l, m, n, o son cada uno independientemente igual a 1, 2 o 3; y

R_4 se selecciona independientemente entre H, alquilo y halógeno.

En el presente documento también se describe que, para R₁ y R₂, el alquilo es preferiblemente metilo o etilo, el alquilo sustituido es preferiblemente -CH₂OH, y el arilo es preferiblemente fenilo o bencilo; para R₃, el acilo es preferiblemente COCH₃.

- 5 En las Fórmulas I-III, los heterocilos preferentes son Indoles, bencenos sustituidos (es decir, fluorofenilos, etc.). Asimismo, en las Fórmulas I-III, el R₄ se indica como una unión variable al anillo aromático e indica que R₄ puede estar mono-, di-, tri- o tetra-sustituido en el anillo aromático y R₄ puede seleccionarse independientemente en cada lugar de sustitución. Otra forma de realización de la presente invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.
- 10 Otra forma de realización de la presente invención se dirige a un método *ex vivo* para interferir con la ruta de transcripción inducida por hipoxia. En general, el método de acuerdo con esta forma de realización comprende poner en contacto una célula con al menos un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.
- 15 Otra forma de realización de la presente invención se dirige a un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas para su utilización en un método para tratar el cáncer de mama que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de al menos un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.
- 20 Otra forma de realización de la presente invención se dirige a un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas para su utilización en un método para tratar el carcinoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de al menos un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Epiditiodicetopiperazinas Sintéticas como Inhibidores de la Transcripción Inducible por Hipoxia

- 25 La presencia de dos regiones α -helicales en el contacto entre el dominio de activación C-terminal HIF1 α (C-TAD) y la región rica en cisteína-histidina p300/CBP 1 (CH1) (Figura 1a) abre una posibilidad para el diseño de antagonistas transcripcionales sintéticos que podrían modular de manera predecible esta interacción. Sin embargo, los péptidos compuestos de menos de 15 residuos de aminoácidos generalmente no forman estructuras α -helicales en condiciones fisiológicas una vez extirpados del entorno proteico. Notablemente, el único intento de alteración de la interacción C-TAD/CH1 con α -hélice fue un planteamiento informado por Kung *et al.* ⁴⁰ en este estudio, C-TAD se expresó como una proteína de fusión con Gal4 que estabilizó el dominio. La proteína resultante suprimió la transcripción de genes inducibles por hipoxia y tuvo un efecto inhibidor sobre el crecimiento de células tumorales humanas modificadas en modelos de xenoinjerto de ratones desnudos. Sin embargo, las dificultades con la administración sistémica y las complicaciones derivadas del uso de retrovirus en células y tejidos dificultan su adaptación generalizada.
- 30 Debido a que la interacción de HIF1 α C-TAD con el coactivador transcripcional p300/CBP es un punto de amplificación significativa de la respuesta biológica, su alteración con ligandos proteicos diseñados podría ser un medio eficaz para suprimir la glicólisis aeróbica y la angiogénesis en cánceres. ⁴¹⁻⁴³ Aunque la superficie de contacto del HIF1 α C-TAD con p300/CBP es extensa (3393 Å²), la inhibición de esta interacción proteína-proteína por interacciones directas es difícil. *En cambio, la inducción de un cambio estructural a uno de los socios de unión (p300/CBP) puede ser suficiente para interrumpir el complejo.* ⁴⁴
- 35 Ya se ha demostrado la estrategia opuesta, en la que la función de la proteína p53 ha sido restaurada por una molécula pequeña. ⁴⁵

La presente invención proporciona un método *ex vivo* para interferir con la ruta transcripcional inducida por la hipoxia. En general, el método implica poner en contacto una célula con cualquiera de los compuestos de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

- 45 Los ejemplos de moléculas pequeñas que representan las estructuras anteriores así como los métodos para diseñar ETP para aplicaciones terapéuticas se describen a continuación.

EJEMPLOS

Diseño y Síntesis de Complejo del Factor de Transcripción Inducible por Hipoxia que se Dirigen Epiditiodicetopiperazinas Diméricas

- 50 *Base Estructural en el Diseño de Epiditiodicetopiperazinas Diméricas Sintéticas*

Se hace notar que solamente los compuestos de las reivindicaciones adjuntas definen el ámbito de protección. Otros compuestos se describen únicamente como ejemplos de referencia

Aunque la inhibición de las interacciones nucleares proteína-proteína con moléculas pequeñas en el pasado ha demostrado ser difícil, ⁴⁶ las búsquedas recientes de ligandos proteicos de alta afinidad han dado lugar a varios logros notables. ^{44, 47-53} Se ha demostrado que dos moléculas pequeñas, quetocina (CTC), ⁵⁴ y quetomina (CTM), ⁵⁵ (Figura 2), inhiben la interacción entre HIF1D C-TAD y p300 / CBP y atenúan la transcripción inducible por hipoxia, aunque el mecanismo exacto de su acción sigue sin estar claro. ⁴⁴ A pesar de los alentadores informes iniciales, se necesita un diseño adicional de los inhibidores de la vía HIF1, porque ambos compuestos inducen necrosis coagulativa, anemia y leucocitosis en animales de experimentación.

La quetocina y la quetomina son dos metabolitos de epiditiodioperatorazina ⁵⁶ (ETP) de los hongos filamentosos de la especie *Chaetomium* que se han caracterizado previamente por tener actividad antimicrobiana. ^{57,58} La síntesis total de estos productos naturales ha sido todo un desafío y para la quetomina no se ha informado hasta la fecha, presumiblemente debido a la falta de métodos para la sulfenilación enantioselectiva de los anillos de dicetopiperazina y la inestabilidad del puente disulfuro hacia las bases y agentes reductores. En condiciones fisiológicas, la parte de disulfuro puenteado puede existir en formas disulfuro o ditiol y se cree que es esencial para la actividad biológica de esta clase de productos naturales. Esta hipótesis está respaldada por nuestros resultados preliminares y por el trabajo reciente de Bernardo y Waring, que han demostrado que solo la forma natural (oxidada) de epiditiodicetopiperazina se reduce de forma activa concentrada en células vivas de una manera dependiente del glutatión. ⁵⁹ Los niveles intracelulares del ETP pueden ser hasta 1500 veces mayores que la concentración aplicada, y el ETP en las células existe casi exclusivamente en la forma reducida. ⁵⁹ Los inventores formularon la hipótesis de que dos anillos ETP redox activos adecuadamente situados en quetocina y quetomina pueden jugar un papel importante en la unión bidentada de alta afinidad de estos compuestos a dominios proteicos dependientes de cisteína-histidina, Zn²⁺. La rigidez de las estructuras de CTC y CTM hace que sea más fácil predecir sus conformaciones biológicamente activas. A pesar de la marcada diferencia en la estructura del armazón central, las dos moléculas asumen conformaciones de baja energía con orientaciones muy similares de los anillos ETP.

Las epiditiodicetopiperazinas diméricas sintéticas se diseñaron conectando los dos anillos ETP a través de un armazón central semirrígido. Dichas moléculas pequeñas pueden ser capaces de alterar el pliegue global y, como resultado, el reclutamiento de p300/CBP por HIF1 α . Para confirmar esto, diseñamos ETPs LS69 y LS72 donde el posicionamiento de los anillos ETP es similar a la quetomina y examinamos su efecto sobre la transcripción de genes inducibles por HIF (Figura 3). Una molécula estructuralmente similar a LS69 que carece de los puentes disulfuro, NP481, también se diseñó y utilizó como un compuesto de control (Figura 3).

Síntesis de Epiditiodicetopiperazinas Diméricas

En el plano sintético, los inventores formaron el puente disulfuro en productos intermedios sintéticos en la última etapa posible. Los inventores introdujeron el disulfuro protegido en una etapa temprana, con la esperanza de que la estabilidad del grupo disulfuro protegido mejoraría y en consecuencia facilitaría la síntesis. ⁶⁰ El puente disulfuro podría regenerarse en una etapa posterior.

El plan sintético implicó tres transformaciones clave (Figuras 4 y 5): i) protección del puente de disulfuro como tioacetal bicíclico, ii) funcionalización de las posiciones C-3 y C-6 del anillo de tioacetal mediante química de carbanión, y iii) regeneración del puente de disulfuro. La bromación de la 1,4-dimetil-2,5-piperazindiona 1 comercialmente disponible seguida de la reacción de 2 con tioacetato de potasio y la subsiguiente eliminación del grupo acetilo en 3 bajo condiciones ácidas proporcionó una mezcla de ditiol cis y trans 4 en buenas condiciones globales de rendimiento (Figura 4). El tioacetal 5 se obtuvo mediante una reacción de ditiol con p-anisaldehído y eterato de trifluoruro de boro con alto rendimiento. Se sabe que la formación de tioacetal procede de los isómeros cis y trans de ditiol. ⁶⁰ La desprotonación regioselectiva de 5 con una base fuerte en la posición de cabeza de puente ⁶¹ y la posterior reacción con cloruro de benciloximetilo (cloruro de BOM) proporcionaron tioacetal 7 monosustituido con buen rendimiento. Del mismo modo, la reacción de 5 con 2 equivalentes de una base fuerte, seguido de la adición de dos equivalentes de cloruro de BOM proporcionó el compuesto 9. La eliminación regioselectiva de un solo grupo bencilo en 9 podría llevarse a cabo con un equivalente de tricloruro de boro, dando como resultado la formación de alcohol 10. Ambos grupos bencilo podrían eliminarse tratando 9 con dos equivalentes de tricloruro de boro, dando como resultado la formación de un diol 12, que se acetila para dar diacetato 13. La regeneración del puente disulfuro en los tioacetales 7, 10 y 13 dio como resultado la formación de los compuestos ETP de anillo único 8, 11 (LS75) y 14, respectivamente. Todos los productos

se purificaron mediante HPLC de fase inversa preparativa y su identidad y pureza se confirmaron mediante NMR y espectrometría de masas.

La preparación de los dímeros de tioacetal unidos se describe en la Figura 5. La desprotonación de la posición de cabeza de puente en tioacetal 7 con base fuerte, seguida de reacción con exceso de α , α' -dibromo-xileno produjo el intermedio 15 que se convirtió en dímeros de tioacetal 16 y 21 por reacción con el segundo equivalente del carbanión generado a partir de 7. La eliminación del grupo protector de bencilo se realizó tratando 16 o 21 con tricloruro de boro. La conversión de los tioacetales protegidos en ETP puenteadas se llevó a cabo de la siguiente manera: la oxidación con ácido i-cloroperbenzoico dio como resultado la formación de monosulfóxidos que se convirtieron in situ al ETP mediante tratamiento con ácido perclórico al 70% en THF. Los productos 19 (LS69) y 24 (LS72) se purificaron mediante TLC preparativa o mediante HPLC de fase inversa usando un gradiente de 5-95% de acetonitrilo y agua con ácido trifluoroacético al 0.05% (TFA). Para facilitar la caracterización, los alcoholes 19 y 24 fueron también acetilados para producir derivados diacetílicos 20 y 26.

Para comparar los efectos biológicos de los ETP y demostrar la importancia del puente disulfuro, también se sintetizó un puente de xilileno bis (1,4-piperazina-2,5-diona, DKP) NP481. Este compuesto es estructuralmente similar al ETP LS69, pero le falta el puente disulfuro. Las actividades de los ETP sintéticos se podrían comparar directamente con la actividad del compuesto DKP en cultivo celular.

RESULTADOS

LS69 y LS72 se unen al dominio CH1 de p300

Antes de emprender una caracterización biofísica y biológica más rigurosa de los ETP dímeros LS69 y LS72, era importante caracterizar primero sus propiedades de unión termodinámica hacia el objetivo, el dominio CH1 de p300. Los inventores llevaron a cabo experimentos SPR en presencia de DTT para imitar el entorno reductor que se encontraría en el medio intracelular. A partir de los sensogramas de SPR está claro que tanto LS69 como LS72 se unen directamente al dominio CH1 etiquetado con GST del p300 humano (como residuos 323-423) con alta afinidad.

Para LS69, los inventores determinaron que la tasa de asociación (k_a) era $6.97 \times 10^3 \pm 0.157 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y la tasa de disociación k_d obtenida para LS69 en la etapa de lavado después de la etapa de asociación fue $1.33 \times 10^{-2} \pm 1.72 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Por lo tanto, la constante de unión medida por análisis de SPR para la unión de LS69 al dominio CH1 de p300 fue "fuera de tasa"/"dentro de la tasa" lo que da un valor de $K_D = 1.09 \text{ } \mu\text{M}$.

Para LS72, la tasa de asociación k_a obtenida mediante análisis SPR fue $4,25 \times 10^3 \pm 85,8$ mientras que en la siguiente etapa de lavado la velocidad de disociación k_d obtenida fue de $1,54 \pm 0.14 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Por lo tanto, la constante de unión obtenida para LS72 es $K_D = 3.62 \text{ } \mu\text{M}$. En base a estos datos, tanto LS69 como LS72 se unen de forma reversible a p300-CH1-GST y muestran una tasa de aceleración rápida y una tasa de desaceleración lenta con disociación gradual de la proteína inmovilizada en la superficie del chip. El DKP NP481 de control no se unió a ninguna concentración probada hasta $5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ (no se muestran los datos).

Las ETP diseñadas regulan a la baja la actividad del promotor inducible por la hipoxia

Los inventores examinaron en primer lugar el efecto de los ETP diseñados en la activación de los promotores inducibles HIF1. Los inventores utilizaron la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 que contiene construcciones de vector integradas cromosómicamente con cinco copias de elemento sensible a la hipoxia (HRE) derivado de la región 5' no traducida (UTR) del gen *VEGF* humano.⁶² Mostraron una excelente activación transcripcional a baja tensión de oxígeno relevante para la hipoxia tumoral.⁶³ Estas líneas celulares se utilizaron en los ensayos informadores de luciferasa. En el transcurso del experimento, las células se incubaron con ETPs LS69, LS72, LS75 y el compuesto DKP NP481. Paralelamente, se utilizaron celdas no tratadas con solo vehículo (DMSO) como controles. Las condiciones de hipoxia se indujeron incubando células con 300 μM de mesilato de desferrioxamina durante 18 h. Las células se cosecharon, se lisaron y los niveles de luciferasa se determinaron mediante un luminómetro.

Los resultados de la medición se ilustran en la Figura 8 con gráficos de barras que ilustran la proporción de niveles de luciferasa inducida por no inducida. Sin compuestos, los niveles de expresión del gen indicador aumentan aproximadamente 56 veces al colocar las células en condiciones de hipoxia. El tratamiento de células con quetomina CTM y compuestos de ETP sintéticos LS69 y LS72 llevó a una reducción significativa en la actividad del promotor inducible por hipoxia (Figura 8). Los efectos observados fueron dependientes de la dosis. En contraste, el tratamiento con ETP LS75 de anillo único dio como resultado solo una pequeña

reducción en la actividad del promotor. Asimismo, el tratamiento con el compuesto DKP NP481 dio como resultado una reducción mínima de la actividad del promotor y no mostró dependencia de la dosis.

Inhibición de la Transcripción Inducible por Hipoxia in vitro

5 Los inventores utilizaron ensayos de RT-PCR cuantitativos en tiempo real para determinar los niveles relativos de *VEGF* mRNA en células hipóxicas tratadas con compuestos de ETP y compuestos DKP de control. En paralelo, las células tratadas con vehículo se utilizaron como controles. Se utilizó el nivel de ARNm del gen de β -glucuronidasa como control para determinar los niveles relativos de transcripción.

10 En células MCF7 cultivadas bajo condiciones hipóxicas, los compuestos de ETP sintéticos LS69 y LS72 regularon a la baja el gen *VEGF* (Figura 9) a niveles que son comparables o en ciertos casos superan los niveles observados con la quetomina. Por lo tanto, LS69 a 600 nM de concentración inhibe la expresión de *VEGF* en ~65%, lo que se aproxima a los niveles de *VEGF* mRNA en las células no inducidas (normóxicas). Los efectos observados fueron dependientes de la dosis. El compuesto de control NP481 no ha mostrado ningún efecto inhibitorio sobre los niveles de *VEGF*.

15 Los inventores también probaron el efecto de los compuestos sobre los niveles de expresión del gen *VEGF* en una línea celular diferente. Las células HeLa fueron seleccionadas para este ensayo. El tratamiento con 200 nM de concentraciones de quetomina, LS69 o LS72 dio como resultado una reducción del ~50% de los niveles de *VEGF* mRNA.

20 El gen c-Met es otro objetivo genético corriente abajo del sistema de factor de transcripción inducible por hipoxia. Tiene cinco repeticiones de secuencia *HRE* en su región promotora y Comoglio et al. han demostrado que *HRE 4* y *HRE 5* son principalmente responsables de la transcripción inducible por hipoxia del gen c-Met. La mutación o supresión de *HRE 4* y *HRE 5* en la secuencia promotora del gen c-Met disminuye significativamente la inducción inducible por hipoxia de su transcripción. Tanto el ARNm como los niveles de proteína de c-Met están significativamente regulados positivamente bajo la hipoxia en muchas líneas celulares de cáncer y la mayoría de estas líneas celulares de cáncer son habitualmente de naturaleza metastásica.

Citotoxicidad de LS72 en la línea celular de cáncer de mama MCF7 y en la línea celular de adenocarcinoma epitelial de pulmón A549

30 Un problema potencial que surge con la utilización de ETP como inhibidores transcripcionales es su citotoxicidad. Por lo tanto, una evaluación cuidadosa de la citotoxicidad es crucial para cada molécula pequeña que actúa como un inhibidor transcripcional con el fin de descartar efectos globales no específicos en la maquinaria transcripcional.

35 Los inventores realizaron experimentos de citotoxicidad para obtener los valores EC_{50} de LS72 en la línea celular de cáncer de mama MCF7 y la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549. El objetivo fue determinar la ventana de concentraciones viables y realizar los experimentos de inhibición de la transcripción en concentraciones significativamente inferiores a los valores EC_{50} en estas líneas celulares.

40 En su trabajo previo⁶⁴ los inventores informaron que el valor de CE_{50} para la quetomina en células MCF7 es de 180 nM. Descubrimos que el LS72 recién diseñado era mucho menos citotóxico para las células MCF7 en comparación con la quetomina. En el ensayo de citotoxicidad de células MTT en células MCF7, el valor de EC_{50} obtenido fue 547 nM después de 24 horas de tratamiento con LS72 (Figura 10). En base a este valor EC_{50} de LS72 en células MCF7, los inventores decidieron medir su efecto sobre la transcripción inducible de HIF a una concentración máxima de 400 nM en células MCF7. Esto es importante para minimizar los efectos no específicos en los niveles de ARNm debido a la reducción de la viabilidad celular.

45 La línea celular A549 es un adenocarcinoma epitelial de pulmón de tipo de célula no pequeña que se sabe que muestra una regulación al alza significativa de genes inducibles por HIF1 α clave, tales como c-Met, *VEGF* y *Glut1* en condiciones hipóxicas. En los ensayos de viabilidad en esta línea celular, los ETP mostraron menos citotoxicidad en comparación con la línea celular MCF7. Después de 24 h de tratamiento con quetomina y LS72 en el medio F-12 modificado por Kahn, se observó un EC_{50} de > 10 μ M. Por lo tanto, el tratamiento de las células se extendió a 48 h para determinar mejor su citotoxicidad.

50 El ensayo de citotoxicidad MTT se llevó a cabo para quetomina y LS72 en la línea celular A549 durante 48 h. La EC_{50} para LS72 obtenida a partir de este ensayo después de un tratamiento de 48 h fue de 2.8 μ M (Figuras 11-12). Este valor es aproximadamente cinco veces mayor que el valor de EC_{50} obtenido en la

línea celular MCF7 después de 24 horas de tratamiento. Estos datos sugieren que la línea celular A549 es mucho más robusta sobre el tratamiento en comparación con la línea celular MCF7. Además, LS72 es claramente mucho menos tóxico para las células en comparación con la quetomina. Dado que los motivos ETP son comunes tanto en LS72 como en la quetomina, los inventores solamente pudieron especular que una mayor toxicidad de la quetomina puede deberse a su motivo cyclotryptophan, que está ausente en LS72.

Modulación de la transcripción inducible de HIF1 α con LS72 en la línea de adenocarcinoma de pulmón A549

El descubrimiento de un buen modelo *in vitro* que muestre de manera consistente una alta activación transcripcional de genes inducibles por hipoxia resultó ser todo un desafío. Después de evaluar varias líneas celulares, los inventores centraron su atención en las células A549, una línea celular de adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas. Se ha informado que la línea celular A549 produce una regulación al alza robusta de los genes inducibles por HIF clave en condiciones de hipoxia. Específicamente, Comoglio et al.¹⁵ informaron que bajo hipoxia, el nivel de mRNA de c-Met está significativamente regulado al alza en la línea celular A549.

Después de las pruebas con varios niveles séricos en los medios y los métodos de inducción de la hipoxia, las condiciones que funcionaron notable y consistentemente bien para la inducción de genes dependientes de HIF1 α fueron mantener las células A549 en suero al 2% seguido de tratar las células con compuesto o control en los medios al 0.2% de suero durante 48 h (Figura 13). En estas condiciones, mientras que la bolsa de hipoxia era la mejor opción para la inducción del gen *LOX*, la mejor respuesta hipóxica que condujo a la regulación al alza de muchos otros genes inducibles por HIF1 α fue el tratamiento con 300 μ M de DFO.

La Figura 13 muestra el efecto del tratamiento con LS72 sobre los niveles de tres genes importantes, *VEGF*, *Glut1* y *cMet*, que se sabe que están regulados al alza en muchos tumores sólidos bajo condiciones hipóxicas.

El tratamiento con LS72 dio como resultado una reducción significativa en la respuesta hipóxica de los genes *VEGF*, *Glut1* y c-Met. Los niveles de *VEGF* se redujeron en un 50%, mientras que los niveles de ARNm de *Glut1* se redujeron más del 60%. c-Met también se reguló a la baja significativamente, alcanzando esencialmente sus niveles normóxicos (Figura 13).

La *LOX* (lisil oxidasa) es otro gen que se regula positivamente bajo la hipoxia y la proteína participa en la regulación de la matriz extracelular durante el comportamiento invasivo y la metástasis del tejido canceroso⁶⁵. El gen *LOX* mostró una mejor inducción con bolsa de hipoxia después de 48 h y mostró una regulación negativa significativa en la actividad transcripcional después del tratamiento con LS72. CXCR4 es un gen que es esencial para la quetominaxis de células madre y células progenitoras durante la curación de una lesión que también está implicada en la migración de células madre de cáncer⁶⁶. El eje SDF1-CXCR4 conduce a la quimiotaxis del progenitor y las células madre al tejido canceroso o a la herida, seguido de su diferenciación. En el sistema modelo de células A549, CXCR4 también se regula al alza más de 100 veces después de la inducción química de hipoxia con DFO o bolsa de hipoxia. Tras el tratamiento con LS72 a una concentración de 400 nM, se observó una excelente inhibición de la actividad transcripcional para el gen CXCR4 (Figura 14).

En general, la línea celular A549 en las condiciones mencionadas anteriormente se convirtió en un muy buen modelo para estudiar la expresión del gen inducible por HIF1 α . Los cinco genes mencionados anteriormente no solo mostraron una alta regulación positiva de la transcripción inducible por HIF1 α de muchos genes clave implicados en la tumorigénesis, sino que también bajo las condiciones dadas mostraron muy pocos cambios en la actividad transcripcional bajo normoxia en presencia de LS72.

Después de obtener una gran inducción transcripcional para los cinco genes *VEGF*, c-Met, *Glut1*, *LOX* y CXCR4 que son regulados al alza por el sistema transcripcional HIF1 α y son regulados a la baja tras el tratamiento con 400 nM de LS72, el siguiente paso lógico fue estudiar la respuesta a la dosis del fármaco. La modulación de la transcripción inducible HIF1 α con LS72 se estudió en tres concentraciones diferentes de 100 nM, 400 nM y 1600 nM.

La inducción de la hipoxia se realizó a una confluencia del 85% de células en medio F-12K sin suero con 300 μ M de DFO.

Para cada concentración de LS72, también se encontraron presentes muestras de control, en que las células se trataron con LS72 pero sin inducción de hipoxia. Los controles mostraron que en las tres

concentraciones diferentes de LS72 en normoxia los niveles de transcripción de *VEGF* no se modificaron significativamente, lo que subraya el hecho de que en estas condiciones LS72 no mostró aumento ni disminución en los niveles transcripcionales debido al estrés o alguna otra vía. Bajo hipoxia LS72 mostró una disminución dependiente de la dosis en la transcripción inducible HIF1 α del gen *VEGF* (Figura 15).

5 El gen *c-Met* en estas condiciones de inducción hipóxica a células altamente confluentes mostró una regulación al alza mejorada de su transcripción. El ARNm de *c-Met* estaba regulado positivamente más de 5 veces más en hipoxia. Se observó una disminución dependiente de la dosis en la regulación al alza transcripcional para *c-Met* tras el tratamiento con LS72 (Figura 16).

10 Glut1 mostró una inducción de 10 veces más en células altamente confluentes. Glut1 también muestra una disminución dependiente de la dosis de la regulación positiva transcripcional hipóxica a 100 nM, 400 nM y 1600 nM de LS72 (Figura 17).

15 CXCR4 es un receptor acoplado a una proteína G que es regulado al alza en condiciones hipóxicas. Los inventores eligieron las células A549 e indujeron la hipoxia con DFO y descubrieron que en el 85% de las células confluentes, los niveles del gen CXCR4 se sobreexpresaban transcripcionalmente más de 650 veces. Tras el tratamiento con LS72 a una concentración de 400 nM y 1600 nM, se pudo observar una disminución dependiente de la dosis en los niveles de ARNm de CXCR4 (Figura 18). Estos hallazgos no solo muestran que CXCR4 se induce transcripcionalmente en células A549 en condiciones hipóxicas, sino que se puede regular negativamente con moléculas pequeñas que se dirigen a la vía HIF1 α .

Regulación a la baja de los niveles de proteína VEGF y c-Met con LS72

20 Después de obtener una regulación a la baja significativa de la transcripción de varios genes clave HIF-1 inducibles, incluyendo *VEGF* y *c-Met*, los inventores estudiaron los niveles de proteína de *VEGF* y *c-Met* para ver si la regulación a la baja observada en los niveles de ARNm también se traduce en la regulación a la baja de los niveles de proteína correspondientes. Se realizaron transferencias Western para medir los niveles de proteína para *VEGF* y *c-Met* en líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 respectivamente tratadas con LS72. Los niveles de proteína *VEGF* mostraron una regulación a la baja significativa con quetomina (200 nM) y LS72 (400 nM) en células MCF7 bajo inducción de HIF1 α con 300 μ M de DFO (Figura 19a). Los niveles de proteínas *c-Met* también mostraron una regulación a la baja significativa en los niveles de proteína inducida por HIF1 α tras el tratamiento con quetomina (200 nM) y LS72 (400 nM) en células MDA-MB-231 (Figura 19b).

30 Perfiles de expresión génica y análisis de micromatrices

35 Dado que las proteínas objetivo p300 y CBP son coactivadores multidominios pleiotrópicos, sus regiones CH1 contienen sitios de unión para múltiples factores de transcripción. Una posible preocupación del uso de ETP para la regulación de genes es la especificidad, ya que la inhibición de la interacción entre CBP/p300 y factores de transcripción distintos de HIF1 α puede dar como resultado un gran número de genes afectados. Para descartar los efectos no específicos de ETPs en todo el genoma, los inventores llevaron a cabo experimentos de perfil de expresión génica *in vitro* con LS72 utilizando Matrices Affymetrix de Gen Humano ST 1.0 que contienen secuencias de oligonucleótidos que representan 28.869 transcripciones.^{67,68}

40 Con el fin de interrogar al genoma celular para efectos globales, se usaron células MCF7 tratadas con LS72 a 400 nM. El tratamiento de células con LS72 a una concentración de 400 nM afectó a la expresión de solo 178 genes a niveles $\geq 2,0$ veces (Figura 20). En comparación, el tratamiento con DFO solo cambió los niveles de 329 genes $\geq 2,0$ veces. De estos, 88 genes se regularon a la baja $\geq 2,0$ veces y 90 – se regularon al alza $\geq 2,0$ veces, respectivamente. En células tratadas con LS72 en condiciones de hipoxia inducida por DFO, los inventores identificaron 190 genes afectados por este compuesto. El análisis de agrupamiento se realizó para identificar similitudes en los perfiles de expresión entre diferentes tratamientos (Figura 19).

45 La Figura 21 muestra la agrupación aglomerativa de genes bajo diferentes condiciones de hipoxia y el tratamiento de LS72 (400 nM). El agrupamiento muestra que en muchos genes el efecto de LS72 bajo hipoxia es anular el efecto de la hipoxia de modo que muchos niveles de transcripción de genes se comportan de manera similar a la observada en vehículo, es decir, normoxia sin tratamiento con LS72.

50 El perfil de expresión de las células tratadas con LS72 bajo hipoxia inducida por DFO es muy diferente del perfil bajo DFO solo. Sin embargo, los perfiles de las células tratadas con LS72 bajo hipoxia inducida por DFO y las células en condiciones de normoxia muestran regiones de similitud. Esto sugiere que el tratamiento con LS72 reduce el efecto del tratamiento con DFO en ciertos grupos de genes, tal como se espera para el inhibidor transcripcional que afecta los genes inducibles por hipoxia. No es del todo

sorprendente que haya cierta superposición en los genes afectados por LS72 y DFO dada la complejidad de las vías de señalización celular implicadas en la respuesta hipóxica. Los resultados también demuestran claramente la especificidad de LS72 en su efecto sobre la inducción de la hipoxia en el contexto de todo el genoma.

- 5 La Tabla 1 enumera los genes importantes que se regulan negativamente bajo hipoxia con el tratamiento con LS72 400 nM en células MCF7. Los datos extraídos de las listas de genes que muestran un cambio de > 2 veces.

- 10 Curiosamente, muchos genes que pertenecen a la familia de proteínas portadoras de soluto (SLC) se regularon a la baja bajo hipoxia con LS72. Se enumeran en la Tabla 2. Esto muestra que bajo hipoxia las proteínas portadoras de soluto se regulan al alza para facilitar una mayor captación y secreción de moléculas en las células y LS72 ha revertido esta tendencia.

Estudio in vivo de la eficacia de LS72 en modelo de xenoinjertos de tumor de ratón usando microscopía intravital

- 15 Se prepararon esferoides tumorales de N2O2 (carcinoma de mama) y se implantaron por vía subcutánea en ratones atímicos. Se dejó que los tumores se vascularizaran durante 10-14 días, después de lo cual los ratones fueron inyectados el día 0 con 1 mg/kg de ($\pm$) -LS72 a través de la vena de la cola. Desde el día 8 hasta el día 13, los ratones fueron inyectados diariamente con 2 mg/kg de ($\pm$) -LS72. Las imágenes de microscopía intravital (IVM), obtenidas en días específicos, se muestran en la Figura 22.

- 20 La Figura 23 muestra la cuantificación del volumen tumoral obtenido de las imágenes IVM. Los datos muestran claramente que en los ratones #1 y #2, inyectados con ($\pm$) -LS72, la vasculatura del tumor y el crecimiento tumoral se suprimen significativamente. En el curso de estos experimentos, ($\pm$) -LS72 mostró muy baja toxicidad para los ratones, tal como se confirma por la observación del comportamiento de los animales y el control de sus pesos corporales. Esta baja toxicidad del bis-ETP diseñado le otorga una ventaja significativa *in vivo* con respecto a la quetomina natural del bis-ETP, que según los informes es tóxica e incluso letal para los animales, ya que los ratones tratados con quetomina no sobreviven después de cinco días de inyección consecutiva.

- 25 En el estudio, los ratones tratados con ($\pm$) -LS72 sobrevivieron al tratamiento de 14 días y no mostraron ningún signo de toxicidad aguda. Este estudio valida la eficacia de ($\pm$) -LS72 como un inhibidor de la expresión del gen inducible por HIF-1 en líneas celulares de cáncer *in vitro* y el crecimiento del tumor en el modelo de xenoinjerto de ratón *in vivo*. ($\pm$) -LS72 es significativamente menos tóxico que la quetomina dentro del intervalo de concentraciones terapéuticas ensayado suficientes para mantener la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*.

- 35 Se llevaron a cabo experimentos adicionales en los que se permitió que los tumores en ratones se vascularizaran durante 10-14 días, después de lo cual se los ratones fueron inyectados en los días 0, 8, 10 y 12 con 1 mg/kg de *meso*-LS72 a través de la vena de la cola. Las imágenes de microscopía intravital (IVM) en días se obtuvieron tal como se describió anteriormente. Los datos muestran que en los ratones inyectados con *meso*-LS72, la vasculatura del tumor y el crecimiento tumoral también se suprimen significativamente. En el curso de estos experimentos, *meso*-LS72 también mostró muy baja toxicidad para los ratones, tal como se confirma por la observación del comportamiento de los animales y el control de sus pesos corporales. Esto establece la eficacia *in vivo* de ($\pm$) -LS72 y *meso*-LS72 a la hora de suprimir el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de ratón.

DESCRIPCIÓN

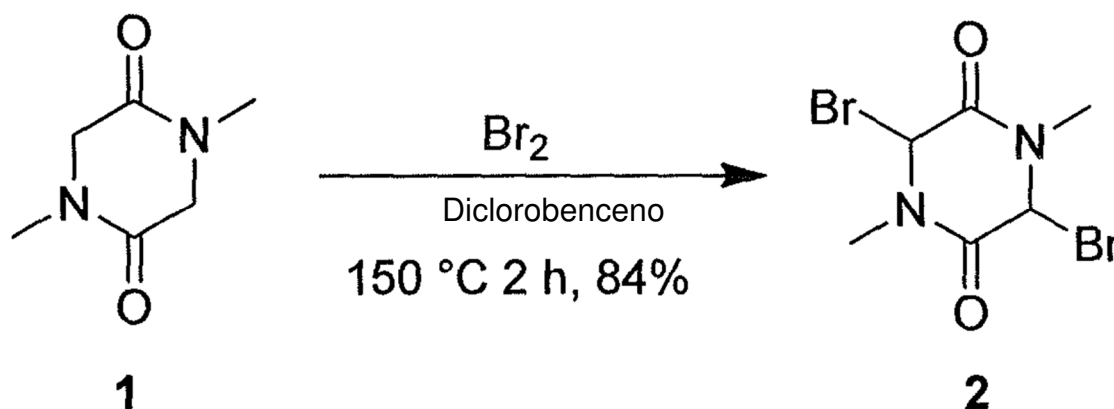
- 45 Tal como se describe en el presente documento, los compuestos de la invención son capaces de alterar la transcripción inducible por hipoxia *in vitro* e *in vivo* con poco efecto perjudicial sobre el crecimiento celular y la tasa de replicación. En las líneas celulares de carcinoma de mama hipóxico MCF7 y MDA-MB-231, el LS72 dimérico diseñado muestra una regulación a la baja significativa de la transcripción inducible por HIF1 α de los genes VEGF y c-Met y sus productos proteicos. En la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549, cinco genes clave VEGF, c-Met, Glut1, LOX y CXCR4 se han regulado a la bajade forma significativa con LS72 de una manera dependiente de la dosis. Los experimentos de perfil de expresión génica proporcionaron importantes conocimientos sobre los efectos genómicos globales de LS72 bajo condiciones de hipoxia. El número y tipo de genes afectados por LS72 es consistente con los resultados previos, lo que sugiere que este compuesto es un inhibidor transcripcional altamente específico con un perfil farmacogenómico bien definido.

Materiales y Métodos

Métodos Generales

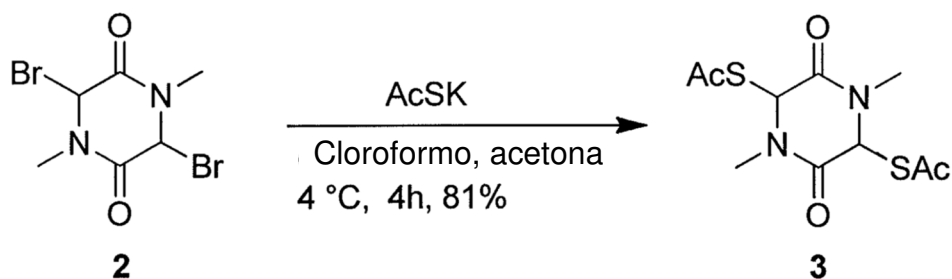
Todos los reactivos y disolventes se obtuvieron a partir de fuentes comerciales y se utilizaron tal como se recibieron a menos que se indique lo contrario. Todas las reacciones que implican reactivos sensibles a la humedad se llevaron a cabo bajo una atmósfera de N_2 seco con disolvente anhidro y material de vidrio secado a la llama. Los líquidos higroscópicos se transfirieron a través de una jeringa y se introdujeron en recipientes de reacción a través de paredes de goma. Las soluciones del producto de reacción se concentraron utilizando un evaporador rotatorio a 30-150 mm Hg. La cromatografía de gravedad se realizó en gel de sílice (malla 230-400) usando disolventes de grado reactivo. La cromatografía de capa fina analítica se realizó sobre placas recubiertas con fondo de vidrio (0.25 mm, gel de sílice 60, F-254, EM Science). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) se recogieron en instrumentos Varian Unity 300 MHz o Bruker 250 MHz, 500 MHz o 600 MHz en los disolventes indicados. Las posiciones de los picos se informan con desplazamientos químicos (δ) en ppm referidos a tetrametilsilano (0 ppm), o las señales resultantes de la deutерación incompleta del disolvente: $CDCl_3$ (7.26 ppm), o la línea central del multiplete de CD_3OD (3.31 ppm). Los espectros de ^{13}C NMR se referenciaron a señales de $CDCl_3$ (77.0 ppm) o CD_3OD (49.2 ppm). Las constantes de acoplamiento (J) se informan en hercios (Hz). Se utilizan las siguientes abreviaturas: solo (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), doblete de dobletes (dd), doblete de tripletes (dt), ancho (br).

Síntesis y Caracterización de Epiditiodiketopiperazinas

20 *Preparación de 1,4-dimetil-2,5-piperazidiona-3,6-dibromuro (2)*

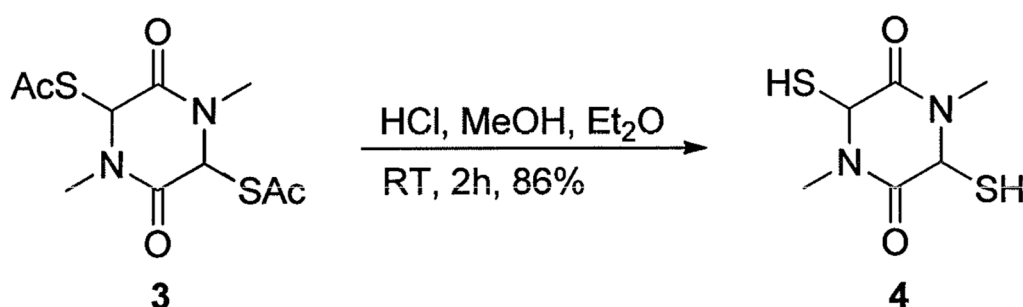
Se añadió bromo (1.03 mL, 3.2 g, 20 mmol, 2eq.) disuelto en o-diclorobenceno (10 mL) gota a gota durante un período de 1 hora a una solución de suspensión de anhídrido de sarcosina (1.42 g, 1 mmol, 1 eq., Avocado, Inc.) en o-diclorobenceno (30 mL). Un precipitado amarillo se formó inmediatamente. La mezcla de reacción se calentó hasta 150°C y se continuó la agitación hasta que cesó el desprendimiento de gas. A continuación, se enfrió la mezcla a TA y se añadieron gradualmente hexanos (200 mL). Se depositaron cristales de color amarillo pálido y la mezcla se dejó reposar durante la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los cristales se filtraron y secaron al vacío. El producto bruto se recrystalizó en una mezcla de cloroformo-éter para dar 1.62 g de producto. Rendimiento 54%, m.p. 128°C , $^1\text{H-NMR}$ ($CDCl_3$, TMS, ppm) δ : 6.00 (s, 2H), 3.07 (s, 6H).

Preparación de 1,4-dimetil-2,5-piperazinediona-3,6-ditioacetato (3)



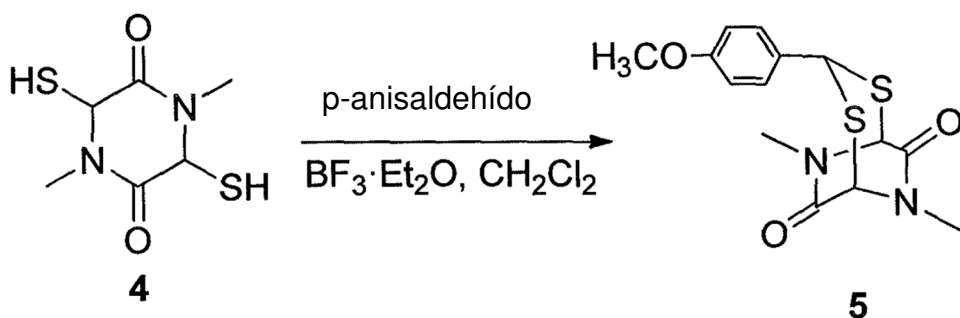
Se añadió tioacetato de potasio (6.2 g, 54 mmol, 2.7 eq.) en porciones durante un período de aproximadamente 1 hora a una solución de Et₃N (3.1 mL, 22 mmol) y 2 en bruto (20 mmol), disueltos en cloroformo (50 mL) y una mezcla de acetona (50 mL) a 4 ° C. La mezcla de reacción se agitó durante 3 h adicionales a 4°C. La muestra registrada por NMR no mostró material inicial. La mezcla se evaporó a presión reducida, el residuo se disolvió en diclorometano y la fase orgánica se lavó varias veces con agua, se secó sobre MgSO₄ y se redujo en volumen en un evaporador rotatorio. La mezcla de jarabe oscuro con algún material cristalino se disolvió en EtOAc y se añadió hexano hasta que la solución se volvió turbia. Se formó material cristalino, que se filtró, se secó para dar 3.3 g (54%) de producto 3, m. p., 204°C, ¹H-NMR (CDCl₃, TMS, ppm) δ : 2.95 (s, 6 H), 2.49 (s, 6 H).

Preparación de 1,4-dimetil-2, 5-piperazinediona-3,6-ditio (4)



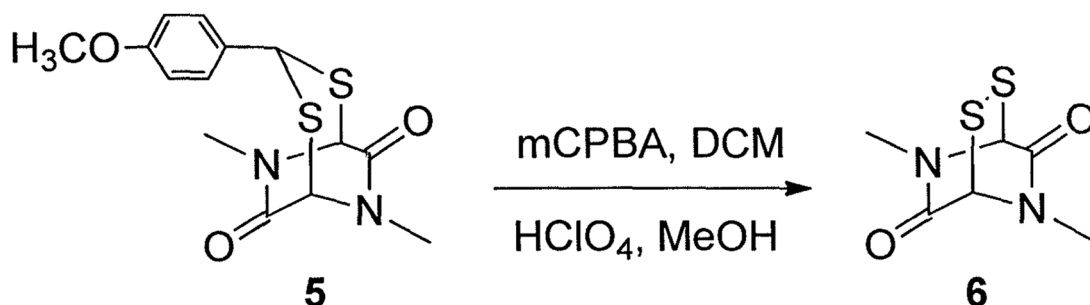
Se suspendió el tioacetato (3, 1.33 g) en MeOH anhidro (40 mL) y se añadió HCl 1 M en éter anhidro (40 mL). La mezcla de reacción se agitó y se calentó a reflujo durante 2 h. La suspensión se volvió amarillenta y la solución se disolvió lentamente. La desaparición del material inicial se controló por TLC y se determinó que se había completado después de 2 h. La solución se concentró al vacío y el residuo se disolvió en cloroformo y se evaporó. El procedimiento de evaporación-disolución de cloroformo se repitió nuevamente para dar 4, 0.8 g (85%). El espectro de NMR se registró en el compuesto bruto. M.p. 108°C. ¹H-NMR (CDCl₃, TMS, ppm) δ = 5.00 (d, 2H, J = 10.3 Hz), 3.09 (s, 6H), 3.06 (d, 2H, J = 10.2 Hz).

Preparación de 3-(4-metoxi-fenil)-6,8-dimetil-2,4-ditia-6,8-diazabicyclo[3.2.2]nonano-7,9-diona (5)



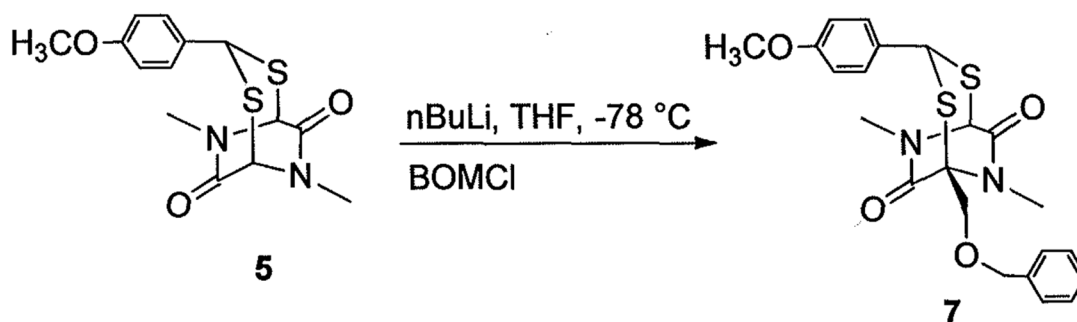
El 4 bruto (1.11 g) y el p-anisaldehído (4.1 mL) se disolvieron en diclorometano (50 mL). A esta solución agitada, se añadió eterato de trifluoruro de boro (250 μ L). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, la solución se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio. La capa acuosa se extrajo a fondo con diclorometano y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 . Después de evaporar el disolvente, el residuo se ensayó mediante TLC (diclorometano -EtOAc, 7:3 R_f 0,45) y se registró la NMR en bruto. El NMR bruto muestra el compuesto objetivo y el exceso de p-anisaldehído. La mezcla bruta se disolvió en diclorometano y el producto se precipitó con éter etílico para dar 590 mg de producto purificado. Del líquido madre se cristalizó una segunda parte del producto, que proporcionó 260 mg de producto. La cantidad total es 850 mg de 5 (50%), m.p. 269°C. ^1H NMR (CDCl_3 , TMS, ppm) δ - 7.38 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.87 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 5.15 (s, 1H), 5.03 (s, 1H), 4.87 (s, 1H), 3.80 (s, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.07 (s, 3H)

Preparación de 1,4-dimetil-2,5-piperazinediona-3,6-disulfuro (6)



Se disolvió tioacetal (5) (18 mg, 0.056 mmol, 1 eq.) en diclorometano anhidro (15 mL) y la solución se enfrió a 0°C. A la solución agitada se añadió ácido m-cloroperbenzoico (15 mg, 0.067 mmol, 1.2 eq, máximo 77% puro). Después de 10 minutos de agitación a 0°C, se añadió dimetilsulfuro (20 μ L). La solución se trató a continuación con 25 μ L de ácido perclórico en metanol (1:5). La solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 8 horas y seguidamente se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio. La capa acuosa se extrajo con diclorometano. La solución de diclorometano se lavó con agua, se secó bajo MgSO_4 y se concentró al vacío para obtener 18 mg de producto bruto. El precipitado blanco se lavó con Et_2O para obtener 8 mg (71%) de producto purificado (6). ^1H -NMR (CDCl_3 , TMS, ppm) δ : 5.22 (s, 2H), 3.11 (s, 3H). ESI MS: Calculado para $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$: 204.0, $[\text{M} + \text{H}]^+$, Encontrado: 204.8.

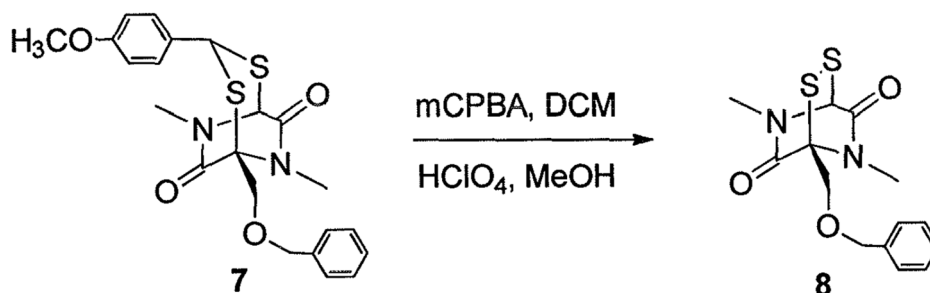
Preparación de 3-(4-metoxifenil)-6,8-dimetil-2-[(fenilmetoxi) metil]-2,4-ditia-6,8-diazabicyclo[3.2.2]nonano-7,9-diona, (7)



Se disolvió Cristalino 5 (388 mg, 1.2 mmol, 1 eq.) y bencil clorometil éter (1.11 mL, 4.8 mmol, 4 eq., 749 mg, 1.25 g, 60% de reactivo solamente) en THF anhidro (40 mL). La solución se enfrió a -78°C y a la mezcla agitada se añadió gota a gota 1,54 M de n-butilio en hexano (1.16 mL (1.8 mmol, 1.5 eq.) durante un período de 5 minutos. Después de agitar la mezcla durante 10 minutos a -78°C, la solución roja turbia resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos. El TLC muestra un producto principal y un poco (~ 20%) de material de partida. A continuación, se añadió solución saturada de NaCl a la mezcla de reacción y la solución roja se extrajo con diclorometano. La solución de diclorometano se lavó con agua dos veces, se secó bajo MgSO_4 y se concentró al vacío. El jarabe se separó en columna (hexano-acetato de etilo, 7-3; R_f 0.43) para dar 364 mg de 5, como un polvo blanquecino (68%). ^1H -NMR (CDCl_3 , TMS, ppm) δ : 7.36 (m, 5H), 7.31 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.84 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 5.11 (s, 1H), 5.04 (s, 1H), 4.74 (d, J = 11.2 Hz, 1 H) 4.54 (d, J=11.2 Hz, 1H), 4.22 (d, J= 10.5 Hz, 1H), 3.82 (d, J = 10.5

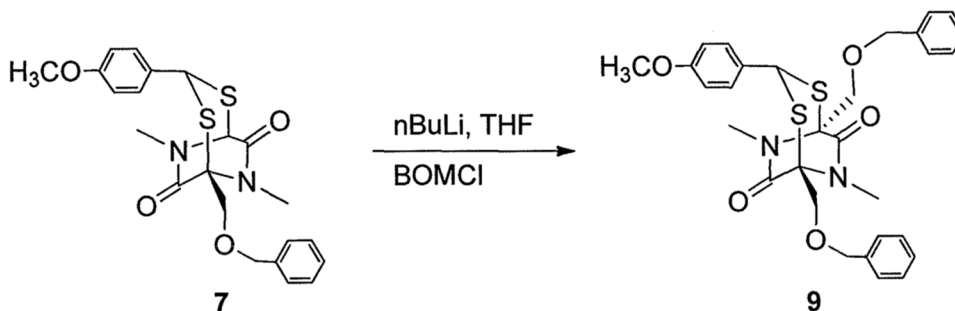
Hz, 1H), 3.79 (s, 3H, 3.23 (s, 3H), 3.10 (s, 3H). FAB-MS: calculado para $C_{22}H_{24}N_2O_4S_2$: 444.1, $[M + H]^+$ encontrado: 445.1.

Preparación de 1,4-dimetil-2-[(fenilmetoxi)metil]-2,5-piperazodnediona-3,6-disulfuro (8)



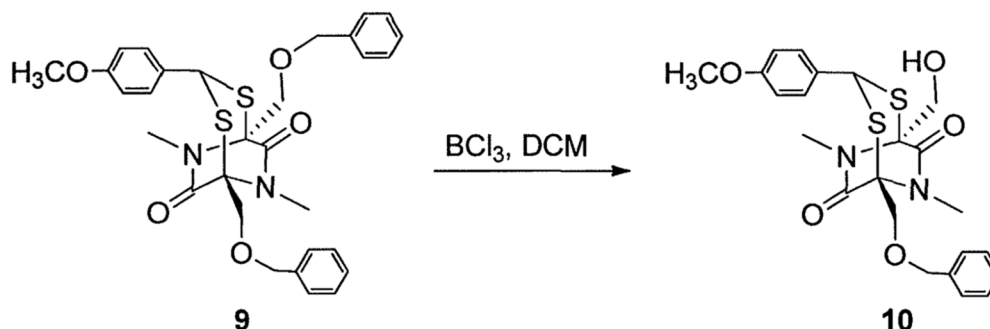
- 5 Se disolvió 7 purificado (9.2 mg, 0.021 mmol, 1 eq.) en diclorometano anhidro (4 mL) y la solución se enfrió a 0°C. A la solución agitada se añadió ácido m-cloroperbenzoico (5.5 mg, 0.025 mmol, 1.2 eq., 77% de pureza). Después de 10 minutos de agitación a 0°C, se añadió sulfuro de dimetilo (4.6 µL). La solución se trató a continuación con 9.2 µL de ácido perclórico, en metanol (i:5). La solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas y seguidamente a 0°C durante 18 horas. La mezcla de reacción fue seguida por HPLC. Después de 18 h no hubo más cambios. La mezcla se evaporó al vacío y se separó mediante HPLC preparativa para dar 3.5 mg (49%) del compuesto 8 puro. 1H -NMR ($CDCl_3$, TMS, ppm) δ : 7.38 (m, 5H), 5.26 (s, 1H), 4.72 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H), 4.22 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H), 3.12 (s, 3H).
- 10

Preparación de 3-(4-metoxifenil)-6,8-dimetil-2, 4-di[(fenilmetoxi)metil] - 2, 4-ditia-6,8-diazabicyclo[3.2.2]nonano-7, 9- diona (9)



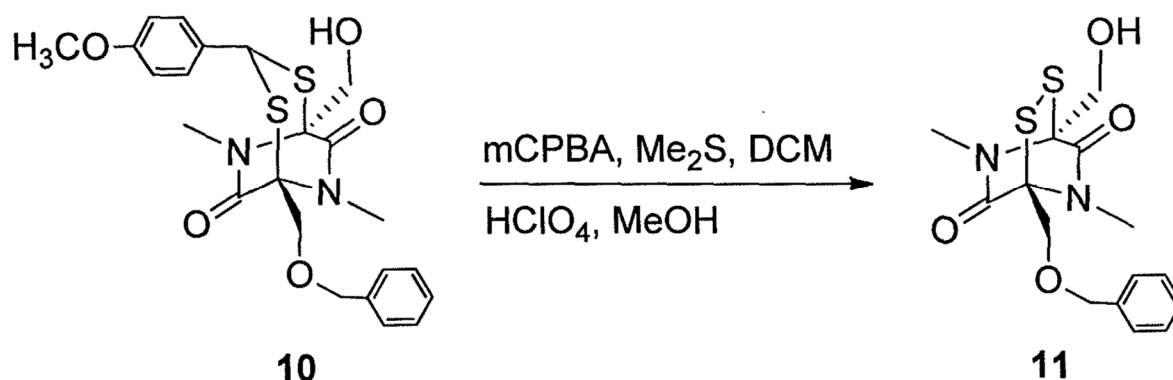
- 15 Se disolvió tioacetal 5 (227 mg, 0.7 mmol, 1 eq.) y 1 mL de bencil clorometil éter (546 mg, 3.5 mmol, 5 eq., 60% de reactivo en la fuente comercial) en THF anhidro (35 mL) y la solución se enfrió a -78°C. A la solución agitada se añadió gota a gota 1.54 M de n-butilitio en hexano (1 mL, 1.54 mmol, 2.2 eq.) durante un período de 10 minutos. Después de agitar la mezcla durante 10 minutos a -78°C, la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Tardó alrededor de 30 min. El TLC muestra un producto principal y ningún material de partida. Se añadió una solución saturada de NaCl a la mezcla de reacción y la solución roja se extrajo con diclorometano. La solución de diclorometano se lavó con agua dos veces, se secó bajo $MgSO_4$ y se concentró a presión reducida. El residuo oleoso se separó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para dar 185 mg de producto 9 disustituido (47%). 1H NMR ($CDCl_3$) TMS, ppm) δ : 7,38 (m; 10H), 7,31 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 5.00 (s, 1H), 4.76 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.61 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 4.49 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 4.30 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 3.83 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.29 (s, 3H), 3.20 (s, 3H). FAB-MS: Calculado para $C_{30}H_{32}N_2O_5S_2$: 564.1, $[M+H]^+$, Encontrado: 565.1.
- 20
- 25

Preparación de 3-(4-metoxifenil)-6,8-dimetil-2-[(fenilmetoxi)metil]-4metilhidroxi- 2,4-ditia-6,8-diazabicyclo [3.2.2]nonano-7,9-diona (10)



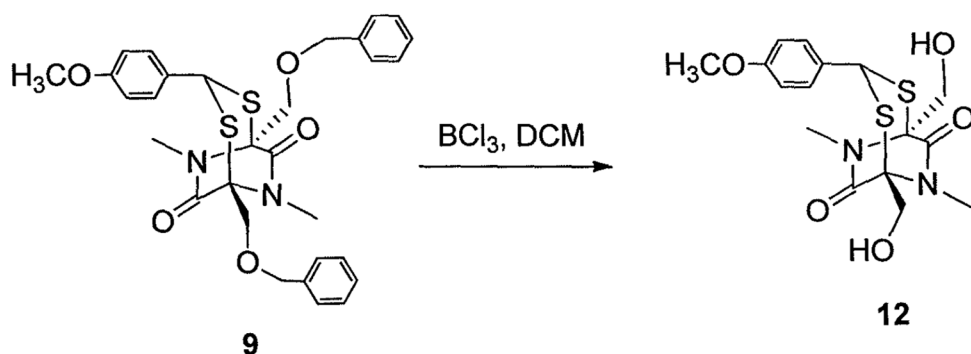
Una solución de 280 mg de 9 (0.5 mmol, 1 eq.) en diclorometano (30 mL) se enfrió a 0°C. A esto, se añadió triclورو de boro 1M (625 μL , 0.625 mmol, 1.25 eq.) en diclorometano gota a gota, durante un período de 30 segundos. La solución se dejó en agitación a 0°C durante 10 minutos y a continuación se vertió en agua helada. La fase acuosa se extrajo con diclorometano. La solución de diclorometano se lavó con agua, se secó en MgSO_4 y se concentró al vacío para obtener 350 mg de producto bruto. El sólido vítreo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice en una mezcla de diclorometano-EtOAc (85-15), R_f 0.44, para proporcionar 175 mg de 10 (74%). ^1H NMR (CDCl_3 , TMS, ppm) δ : 7.30 (m, 5H), 7.28 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.83 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 5.00 (s, 1H), 4.69 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 4.30 (dd, J = 12.6 y 5.4 Hz, 1H), 3.99 (dd, J = 12.6 y 9.9 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.73 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 3.31 (s, 3H), 3.15 (s, 3H), 3.15 (m, 1H). FAB-MS: Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$: 474.1, $[\text{M}+\text{H}]^+$, Encontrado: 475.1.

Preparación de 1,4-metil-2-metilhidroxi-5-[(fenilmetoxi)metil]-2,5-piperazidnediona-3,6-disulfuro (11)



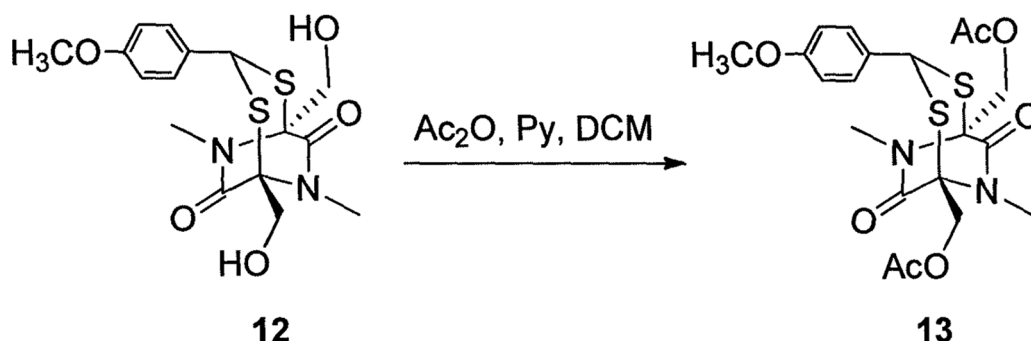
El 10 purificado (20 mg, 0.035 mmol, 1 eq.) se disolvió en diclorometano anhidro (10 mL) y la solución se enfrió a 0°C. A la solución agitada se añadió ácido m-cloroperbenzoico (10 mg, 0.043 mmol, 1.2 eq, máximo 77% de pureza). Después de 10 minutos de agitación a 0°C, se añadió sulfuro de dimetilo (13 μL). La solución se trató luego con 16 μL de ácido perclórico, en metanol (1:5). La solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 8 h y a continuación se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio. La capa acuosa se extrajo con diclorometano. La solución de diclorometano se lavó con agua, se secó bajo MgSO_4 y se concentró a vacío para dar 18 mg de producto bruto. El precipitado blanco se lavó con Et_2O para obtener 8 mg (71%) del producto puro final 11. ^1H NMR (CDCl_3 , TMS, ppm) δ = 7.38 (m, 5H), 4.76 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.71 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 4.36 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.28 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 4.24 (d, J = 12.6 Hz, 1H), 4.23 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.16 (s, 3H).

Preparación de 3-(4-metoxifenil)-6,8dimetil-1,5-bis(hidroximetil)-2,4-ditia-6,8-diazabicyclo[3.2.2]nonano-7,9-diona (12)



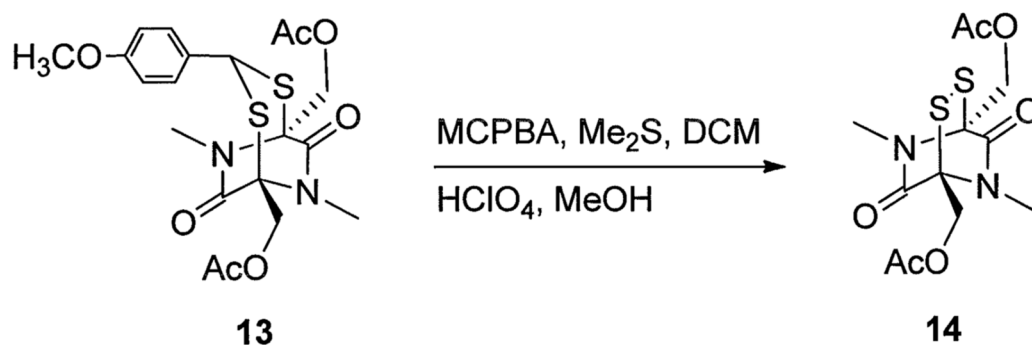
Una solución de 40 mg de 9 (0.071 mmol, 1 eq.) en diclorometano (10 mL) se enfrió a 0°C. A la solución agitada se añadió tricloruro de boro 1M (180 µL, 0.18 mmol, 2.5 eq) en diclorometano gota a gota durante un período de 30 segundos. La solución se dejó agitar a 0°C durante 10 min. y a continuación se vertió en agua con hielo. La fase acuosa se extrajo con diclorometano. La solución de diclorometano se lavó con agua, se secó bajo MgSO_4 y se concentró al vacío para obtener 35 mg de producto en bruto. El sólido cristalino se ensayó en TLC y se purificó en columna en una mezcla de diclorometano-acetona (8:2), R_f 0.28, para dar 25 mg de 12 (93%). ^1H NMR (CDCl_3 , TMS, ppm) δ = 7.31 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 5.01 (s, 1H), 4.64 (dd, J = 9.3 y 4.8 Hz, 1H), 4.32, (dd, J = 12.3 y 4.5 Hz, 1H), 4.01 (d, J = 12.3 y 10.2 Hz, 1H), 3.82 (dd, J = 9.3 y 4.2 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 2.86 (dd, J = 9.9 y 4.8 Hz, 1H), 2.56 (dd, J = 9.9 y 5.1 Hz, 1H). FAB-MS: Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$: 384.0, $[\text{M}+\text{H}]^+$, Encontrado: 385.1.

Preparación de 3-(4-metoxifenil)-6,8-dimetil-2,4-di[(acetiloxi)]metil-2,4-ditia-6,8-diazabicyclo[3.2.2]nonano-7,9 diona (13)



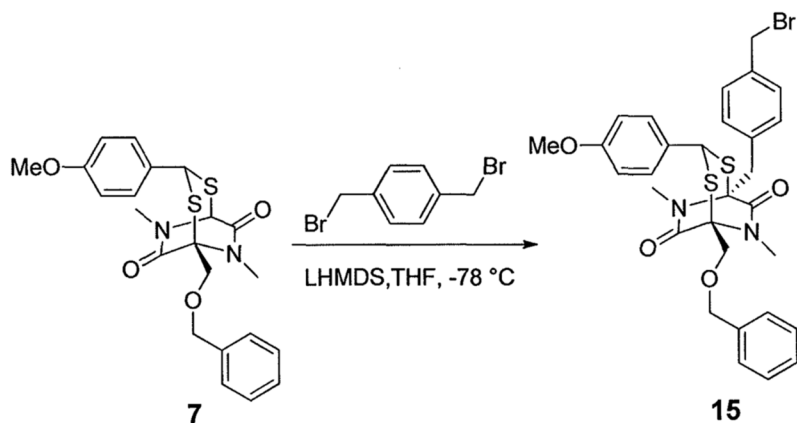
El diol 12 (3 mg) se disolvió en diclorometano (500 µL y piridina (100 µL) y se añadió Ac_2O (100 µL). Después de 16 h, no se detectó material de partida y solo se detectó un nuevo producto mediante TLC. La solución se diluyó con diclorometano (20 mL), se añadió hielo y la reacción se agitó durante 2 h. La capa orgánica se lavó con una solución saturada de NaHCO_3 . Después de la evaporación a presión reducida, el residuo se purificó por HPLC para dar 3 mg de producto 13 (82%). ^1H NMR (CDCl_3 , TMS, ppm) δ : 7.30 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.86 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 5.03 (s, 1H), 4.64 (dd, J = 9.3 y 4.8 Hz, 1H), 4.32, (dd, J = 12.3 y 4.5 Hz, 1H), 4.01 (d, J = 12.3 y 10.2 Hz, 1H), 3.82 (dd, J = 9.3 y 4.2 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 2.86 (dd, J = 9.9 y 4.8 Hz, 1H), 2.56 (dd, J = 9.9 y 5.1 Hz, 1H).

Preparación de 1,4-dimetil-3,6-di(acetiloxi)metil-2,5-piperazinediona-3, 6-disulfuro (14)



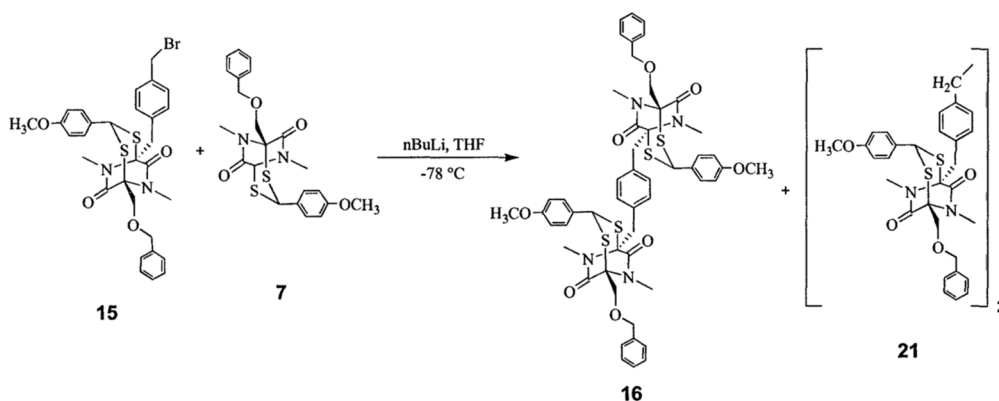
El 13 purificado (30 mg, 0.055 mmol, 1 eq.) se disolvió en diclorometano anhidro (8 mL) y la solución se enfrió a 0°C. A la solución agitada se añadió ácido ncloroperbenzónico (17 mg, 0.077 mmol, 1.4 eq, pureza máxima del 77%). Después de 10 minutos de agitación a 0°C, se añadió fdimetilsulfuro (10 DL). La solución se trató luego con 20 µL de ácido perclórico, en metanol (1:5). La solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 18 h y a continuación se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio. La capa acuosa se extrajo con diclorometano. La solución de diclorometano se lavó con agua, se secó bajo MgSO₄ y se concentró al vacío. El residuo sólido se purificó por HPLC para dar 14, rendimiento 7 mg (31%). ¹H NMR (CDCl₃, TMS, ppm) δ: 4.97 (d, J = 12.6 Hz, 2H), 4.76 (d, J = 12.6 Hz, 2H), 3.13 (s, 6H), 2.16 (s, 6H). HRFAB-MS: Calculado para C₁₂H₁₆N₂O₆S₂: 348.045, [M+H]⁺, Encontrado: 349.053.

Preparación de 3-(4-metiloxi-fenil)-6,8-dimetil-1-[(fenilmetoxi)metil]-5[(4-bromometilfenil)metil]-2,4-ditia-6, 8-diaza-biciclo[3.2.2]nonano-7,9-diona (15)



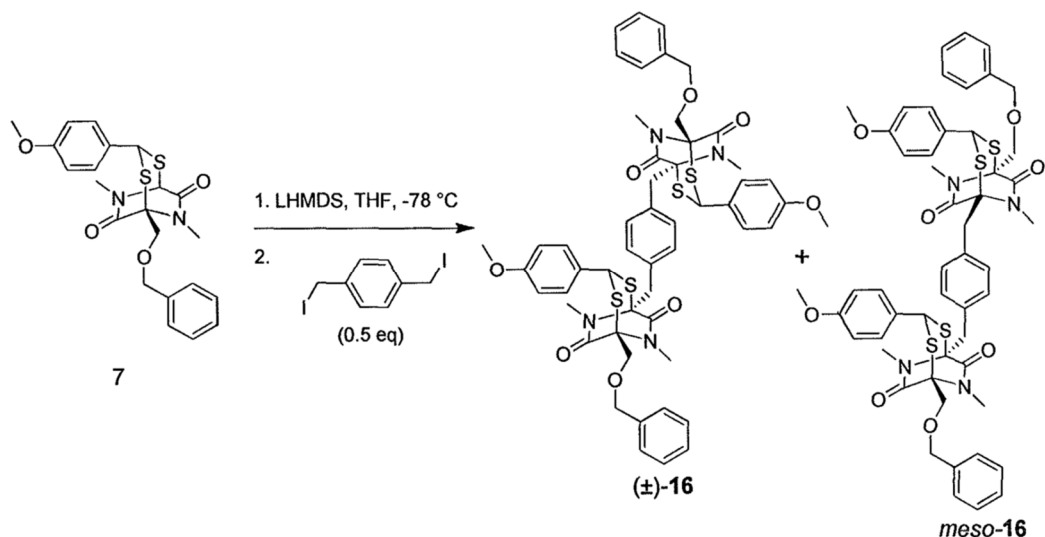
El tioacetal protegido (444 mg, 1 mmol, 1 eq.) y dibromo-p-xileno (1.58 g, 6 mmol, 6 eq.) se disolvió en THF anhidro (80 mL) y se enfrió a -78°C. A continuación, se añadió gota a gota una solución 1 M de LHMDS en THF (1.3 mL, 1.3 mmol, 1.3 eq) durante un período de 3 minutos con agitación. La agitación se continuó a -78°C durante 5 minutos adicionales después de la adición. El baño de enfriamiento se retiró a continuación, y la mezcla se dejó calentar y reposar a temperatura ambiente durante 3 h. Se añadió una solución saturada de NaCl a la mezcla de reacción y la solución roja se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo sólido se separó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando CH₂Cl₂ para dar 388 mg del producto (77% de rendimiento). ¹H NMR (CDCl₃, TMS, ppm) δ: 7.33 (m, 9H), 7.13 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 5.08 (s, 1H), 4.78 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.37 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 4.32 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 3.85 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.15 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 2.97 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, ppm) δ: 165.72, 165.46, 160.55, 137.39, 136.30, 135.50, 130.46, 129.38, 128.75, 128.45, 127.93, 127.78, 126.52, 114.39, 74.02, 73.39, 71.07, 68.68, 55.37, 51.24, 40.21, 33.07, 29.80, 28.08. FABMS: Calculado para C₃₀H₃₁BrN₂O₄S₂: 626.1, [M+H]⁺, Encontrado: 627.0.

Preparación de 3-(4-metoxi-fenil)-6,8-dimetil-1-[(fenilmetoxi)metil]-5[(4-{3-(4-metoxifenil)-6,8-dimetil-1-[(fenilmetoxi)metil]-2,4-ditia-6,8-diazabicyclo[3,2,2]nonano-7,9-diona-5yl}metilfenil)metil]-2,4-ditia-6,8-diazabicyclo[3,2,2]nonano-7,9-diona (16) y bis {3-(4-metoxi-fenil)-6,8-dimetil-1-[(fenilmetoxi)metil]-2,4-ditia-6,8-diazabicyclo[3,2,2]nonano-7,9-diona-5[(4-metilfenil)metil]} (21)



Una solución de 196 mg de 7 (0.44 ml de mmol, 1 eq.) así como 413 mg de 15 (0.66 mmol, 1.5 eq.) en THF anhidro (60 mL) se enfrió a -78°C. A la solución agitada se añadió gota a gota 2.5 M de n-butilio en hexano (264 µL, 0.66 mmol, 1.5 eq.) durante un período de 30 segundos. Después de agitar la mezcla durante 5 minutos a -78°C, la reacción se verificó mediante TLC y parecía que había una nueva mancha pero muchos materiales de partida. De forma gradual, se añadieron, 150 µL adicionales de n-butilio, pero después de cada porción (~30 µl), la mezcla de reacción se probó mediante TLC. Finalmente, la TLC no mostró material de partida de 7. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente mientras se agitaba. Tardó alrededor de 30 min. La TLC muestra un producto principal y un poco (~ menos del 5%, dibromuro) de material de partida. La solución orgánica se diluyó con 150 mL de diclorometano y la solución de NaCl saturada se lavó varias veces. La solución orgánica se secó bajo MgSO₄ y se concentró al vacío. El residuo sólido se separó en columna, en una mezcla de hexano-EtOAc, 6:4. Hubo dos nuevos dímeros 21 (54 mg, 16%, R_f 0.42, HRFAB-MS: calculado para C₆₀H₆₂N₄O₈S₄ 1094.345 [M+H]⁺, Encontrado 1095,356) y 16 (107 mg, 36%, R_f 0,35, FAB-MS: calculado para C₅₂H₅₄N₄O₈S₄: 990,282, [M+H]⁺, Encontrado: 991,291). El siguiente paso se llevó a cabo a partir de este material en bruto.

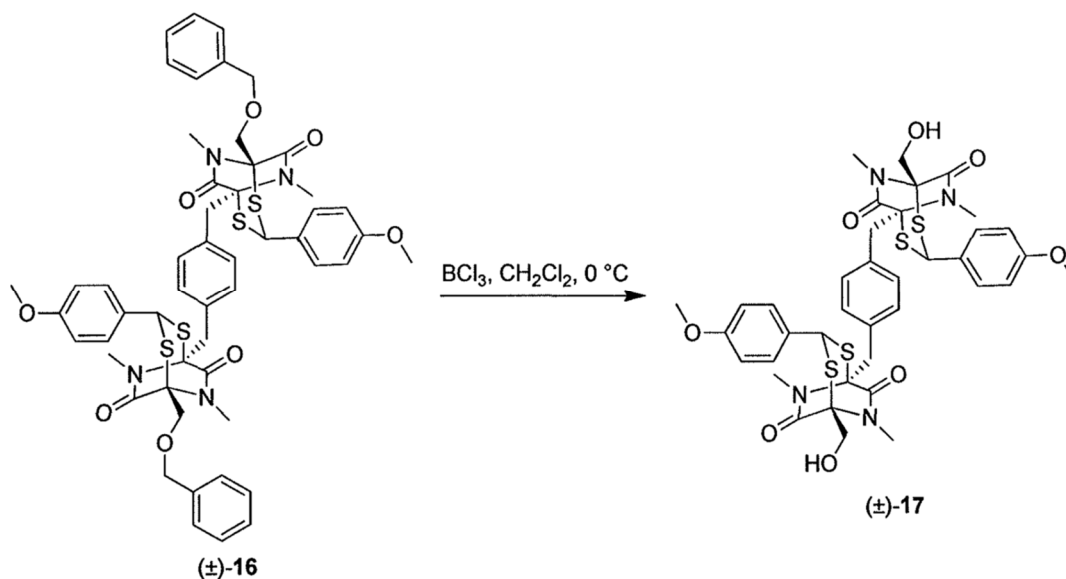
5,5'-(1,4-fenilenbis(metileno))bis(1-(benciloximetil)-3-(4-metoxifenil)-6,8-dimetil-2,4-ditia-6,8-diazabicyclo [3.2.2]nonano-7,9-diona) (16)



Una solución de 7 (0.33 g, 0.75 mmol) en THF seco (15 mL) se enfrió a -78°C. A continuación, se añadió gota a gota una solución 1 M de LHMDS en THF (1.0 mL, 1.0 mmol) durante un período de 2 minutos con agitación. El α, α'-diyodo-p-xileno (88 mg, 0.25 mmol), disuelto en 2 mL de THF se añadió a continuación gota a gota a la mezcla de reacción y la solución se dejó calentar a temperatura ambiente durante 3 h. Se añadió agua a la reacción y la mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos

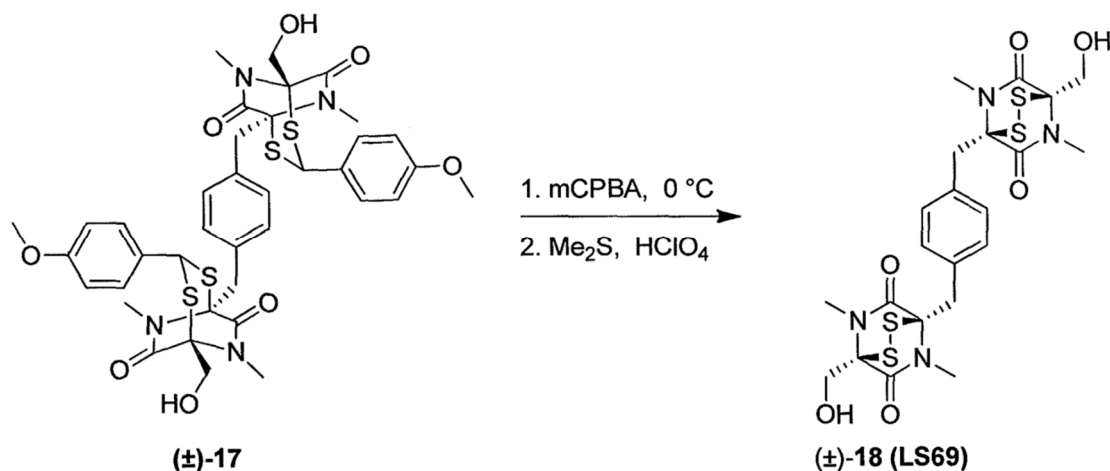
combinados se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Una mezcla de diastereoisómeros *meso* 16 y ($\pm$)-16 (0.20 g, 80%) se separó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando CH_2Cl_2 : Hexano: EtOAc = 5: 4: 1 como eluyente. Para ($\pm$)-16 ^1H NMR (CDCl_3 , ppm) δ : 7.33 (m, 14H), 7.07 (s, 4H), 6.84 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 5.06 (s, 2H), 4.78 (d, J = 12.20 Hz, 2H), 4.56 (d, J = 12.20 Hz, 2H), 4.36 (d, J = 16.39 Hz, 2H), 4.28 (d, J = 10.67 Hz, 2H), 3.82 (d, J = 10.67 Hz, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.34 (s, 6H), 3.08 (d, J = 16.39 Hz, 2H), 2.94 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , ppm) δ : 165.76, 165.50, 160.45, 137.27, 133.72, 130.43, 128.78, 128.44, 127.92, 127.84, 126.52, 114.31, 73.97, 73.39, 71.00, 68.51, 55.35, 51.03, 40.23, 29.80, 28.08. HRMS (FAB) m/z - calculado para $\text{C}_{52}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_4^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 991.290, Encontrado: 991.291.

($\pm$)-5,5'-(1,4-Fenilenobis(metileno))bis-1-(hidroximetil)-3-(4-metoxifenil)-6,8-dimetil-2,4-ditia-6,8-diazabicyclo[3.2.2]nonano-7,9diona), ($\pm$)-17



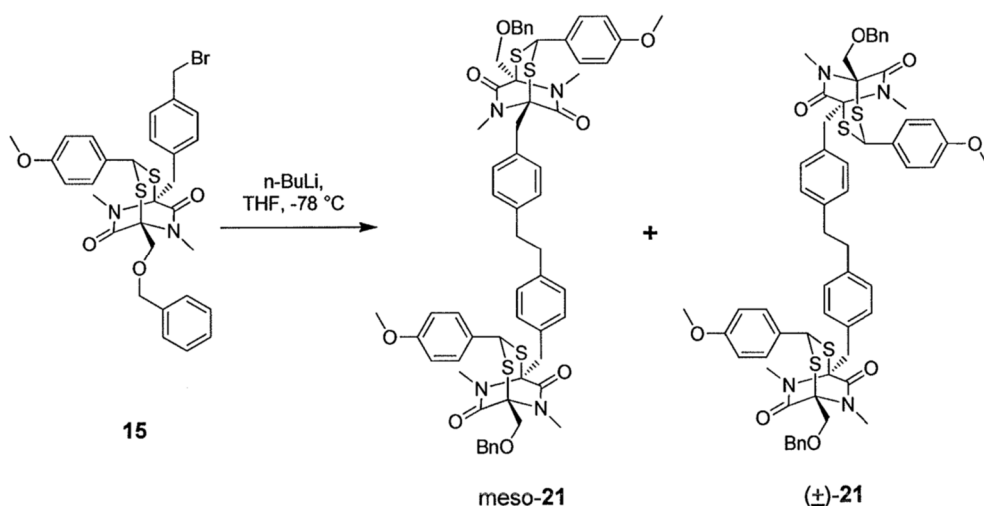
A una solución de ($\pm$)-16 (0.13 g) 0.13 mmol) en diclorometano (10 mL) enfriado a 0°C , se añadió tricloruro de boro (solución 1M en CH_2Cl_2 , 320 μL , 0.32 mmol) gota a gota con agitación. La solución se agitó a 0°C durante 10 minutos adicionales y luego se vertió en agua helada (10 mL) y se extrajo con diclorometano (25 mL). La capa orgánica se lavó dos veces con agua, se secó con MgSO_4 anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el producto bruto como un sólido blanco. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ = 7: 3) para proporcionar ($\pm$)-17 (93 mg, 91%). ^1H NMR (CDCl_3 , ppm) δ : 7.32 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 7.03 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 5.08 (s, 2H), 4.37 (d, J = 16.24 Hz, 1H), 4.33 (dd, J = 12.60 Hz y 5.54 Hz, 2H), 4.05 (dd, J = 12.6 Hz y 9.93 Hz, 2H), 3.81 (s, 6H), 3.42 (s, 6H), 3.06 (d, J = 16.24 Hz, 2H), 2.95 (dd, J = 9.93 Hz y 5.54 Hz, 2H), 2.91 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , ppm) δ : 166.67, 165.83, 160.45, 133.70, 130.42, 128.80, 126.45, 114.39, 73.20, 71.12, 62.98, 55.39, 50.98, 40.42, 29.79, 27.98. HRMS (ESI) m/z : calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_4^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 811.196, Encontrado: 811.195.

(±)-4,4'-(1,4-Fenilenbis(metileno))bis(1-(hidroximetil)-5,7-dimetil-2,3-ditia-5,7-diazabicyclo[2.2.2]octano-6,8-diona), (±)-18, LS69



Se añadió ácido m-cloroperbenzoico (22 mg, 77% de contenido máximo, 0.10 mmol) a una solución enfriada con hielo de (±)-17 (33 mg, 0.040 mmol) en diclorometano anhidro (10 mL) con agitación. Después de 10 horas de agitación a 0°C, se añadió sulfuro de dimetilo (10 µL), seguido de tratamiento con 20 µL de una solución de ácido perclórico al 70% en metanol (1:5). La solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 9 h. La mezcla de reacción se vertió en un bicarbonato de sodio saturado. La solución se extrajo con diclorometano (3 x 30 mL). Los extractos orgánicos combinados se combinaron, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo vítreo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, CH₂Cl₂/EtOAc=6:4) para proporcionar (±)-18 (LS69) (11 mg, 33%).
¹H NMR (DMSO-D₆, ppm) δ = 7.24 (s, 4H), 5.90 (t, J = 5.50 Hz, 2H), 4.33 (dd, J = 12.83 Hz y 5.50 Hz, 2H), 4.23 (dd, J = 12.83 Hz y 5.50 Hz, 2H), 3.89 (d, J = 16.04 Hz, 2H), 3.73 (d, J = 16.04 Hz, 2H), 3.13 (s, 6H), 2.82 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, ppm) 6:165.35, 164.92, 133.45, 128.89, 76.33, 75.91, 59.12, 35.50, 28.31, 27.89. HEMS (FAB) m/z- calculado para C₂₂H₂₆N₄O₆S₄Na⁺[M+Na⁺]: 593.063, Encontrado: 593.063.

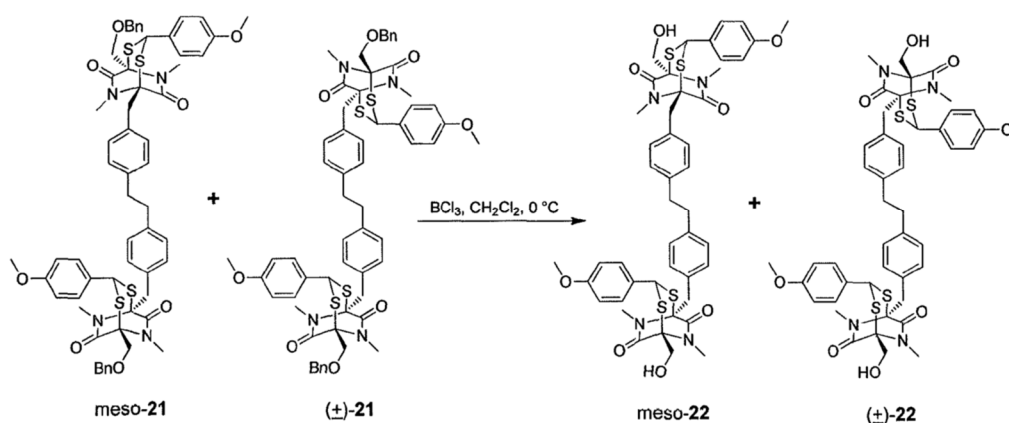
5,5'- ((Etano-1,2-diylbis(4-1-fenileno))bis(metileno))bis(1-((benciloxi)metil)-3-(4-metoxifenil)-6,8-dimetil-2,4-ditia-6,8-diazabicyclo[3.2.2]nonano-7,9-diona) (21).



Una solución de 15 (2.14 g, 3.40 mmol, 1.0 eq.) se enfrió a -78°C y se añadió gota a gota y en condiciones de agitación durante un período de 2 minutos 1.6 M de n-butilio en hexano (2.77 mL, 4.43 mmol, 1.3 eq.). Después de la adición, la agitación se continuó a -78°C durante 5 minutos adicionales. El baño de enfriamiento se retiró a continuación y la mezcla se dejó calentar gradualmente a temperatura ambiente durante el período de 3 h. La mezcla de reacción se vertió en agua helada y se extrajo con diclorometano (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para producir el producto como una mezcla de meso-21 y (±)-21. Los productos se purificaron a partir de los reactivos mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice

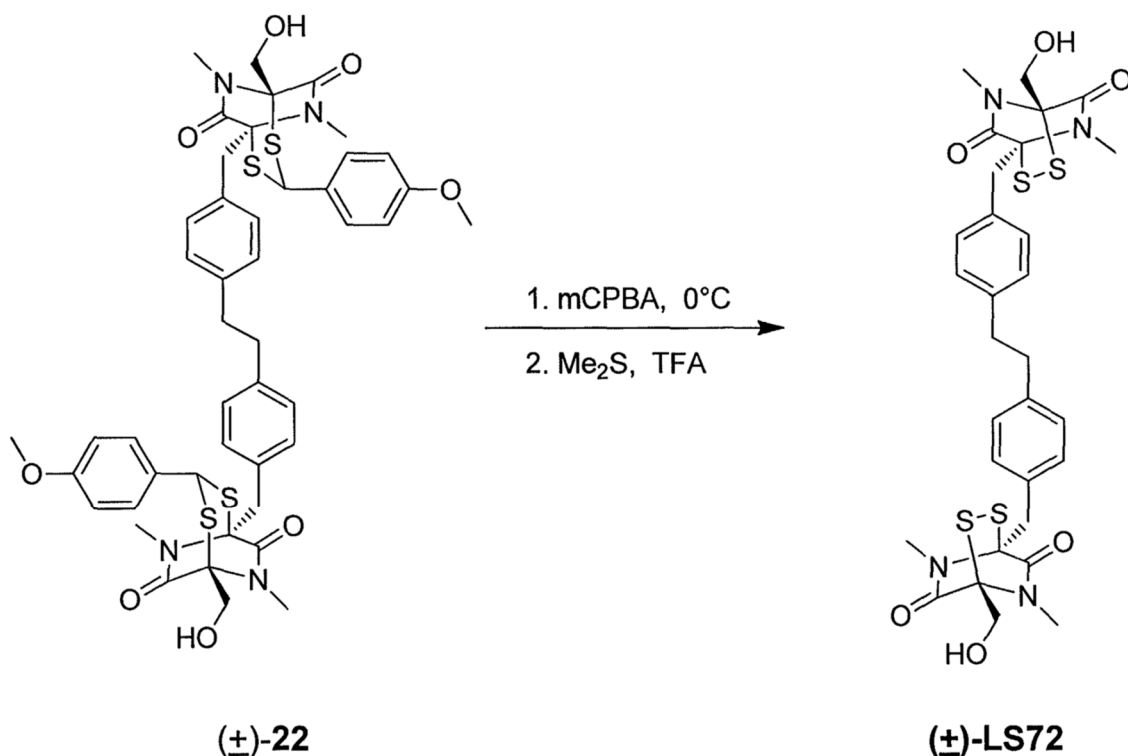
utilizando CH₂Cl₂: Hexano: EtOAc = 5: 4: 1 como eluyente y se utilizaron como una mezcla en la siguiente etapa. Rendimiento total: 638 mg (34%). Una muestra del producto obtenido se sometió a una segunda cromatografía de columna sobre gel de sílice utilizando el mismo sistema de eluyente, donde una porción de (±)-21 racémico se separó de la mezcla de (±)-21 y meso-21 y se usó para análisis. Datos de análisis para (±)-21: ¹H NMR (CDCl₃ ppm) δ: 7.34 (m, 14H), 7.08 (q, 8H), 6.85 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 5.07 (s, 2H), 4.78 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 4.56 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 4.36 (d, J = 16.8 Hz, 2H), 4.31 (d, J = 10.7 Hz, 2H), 3.84 (d, J = 10.7 Hz, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.34 (s, 6H), 3.10 (d, J = 16.8 Hz, 2H), 2.97 (d, 6H), 2.86 (s, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃ ppm) δ: 165.76, 165.63, 160.51, 140.26, 137.44, 132.66, 130.46, 128.69, 128.42, 127.89, 127.76, 126.67, 114.36, 74.00, 73.56, 71.08, 68.71, 55.36, 51.23, 40.24, 37.27, 29.78, 28.07. HRFABMS: Calculado para C₆₀H₆₂N₄O₈S₄ 1094.345, [M+H]⁺, Encontrado 1095.356.

5,5'-((Etano-1,2-diilbis(4,1-fenileno))bis(metileno))bis(1(hidroximetil)-3-(4-metoxifenil)-6,8-dimetil-2,4-ditiazabicyclo[3.2.2]nonano-7,9-diona) (22)



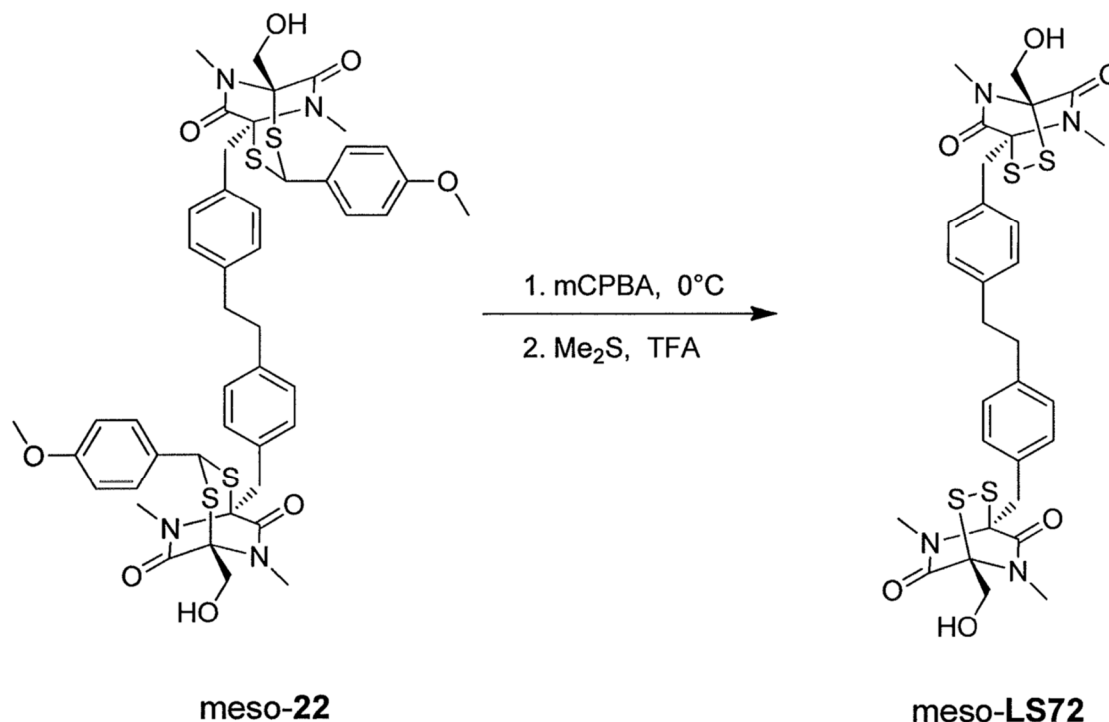
A una solución enfriada con hielo de 21 (125 mg, 0.126 mmol, 1 eq.) en diclorometano, se añadió gota a gota una solución 1 M de tricloruro de boro en diclorometano (320 µL, 0.32 mmol, 2.5 eq) mientras se agitaba. La mezcla se dejó reposar a 0°C durante 15 minutos y a continuación se vertió en agua helada. La capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. La mezcla de reacción en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 78 mg de una mezcla de producto de meso- 22 y (±)-22 como un sólido blanco (75% de rendimiento combinado). La mezcla de meso-22 y (±)-22 se purificó adicionalmente en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de EtOAc en diclorometano del 10% al 50% para separar meso-22 y (±)-22. Datos analíticos para (±)-22: ¹H NMR (CDCl₃ ppm) δ: 7.32 (d, 4H), 6.93 (d, 4H), 6.89 (d, 4H), 6.86 (d, 4H), 5.08 (s, 2H), 4.47 (dd, J = 6 Hz, 13 Hz, 2H), 4.37 (d, 2H), 4.26 (m, 2H), 3.98 (dd, J = 10 Hz, 13 Hz, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.41 (s, 6H), 2.98 (d, 2H), 2.84 (s, 6H), 2.69 (d, 2H). ¹³C NMR (DMSO-d₆; ppm) δ: 165.42, 165.19, 160.06, 140.00, 132.93, 130.52, 128.53, 128.42, 126.82, 114.38, 73.47, 71.51, 60.79, 55.29, 49.91, 40.14, 36.36, 29.60, 27.96. FABMS: Calculado para C₄₆H₅₀N₄O₈S₄: 914.3 [M+Na]⁺ Encontrado: 936.9. Datos analíticos para meso-7 ¹H NMR (CDCl₃, ppm) δ: 7.33 (d, 4H), 7.02 (d, 4H), 6.99 (d, 4H), 6.86 (d, 4H), 5.09 (s, 2H), 4.35 (dd, J = 10 Hz, 13 Hz, 2H), 4.37 (d, 2H), 3.11 (m, 2H), 4.04 (dd, J = 10 Hz, 13 Hz, 2H), 3.81 (s, 6H), 3.41 (s, 6H), 2.91 (s, 6H), 2.85 (s, 4H). ¹³C NMR (DMSO-d₆, ppm) δ: 165.47, 165.24, 160.10, 140.04, 132.96, 130.56, 128.55, 128.48, 126.85, 114.42, 73.50, 71.55, 60.83, 55.34, 49.96, 40.14, 36.42, 29.63, 28.00. FABMS: Calculado para C₄₆H₅₀N₄O₈S₄: 914,3 [M+Na]⁺, Encontrado: 936,9.

(±)-4,4'-((etano-1,2-(diylbis(4,1-fenileno))bis(metileno))bis(1(hidroximetil)-5,7-dimetil-2,3-ditia-5,7-diazabicyclo[2.2.2]octano-6,8-diona))((±)-LS72,(±)-23)



Un matraz de fondo redondo de 50 mL se cargó con ditioacetal (±)-22 (20 mg, 0.022 mmol) que se disolvió en 35 mL de CH₂Cl₂. El matraz se enfrió a 0°C y se añadió un exceso de ácido m-cloroperbenzoico (15 mg, 77% de contenido, 0.07 mmol). Después de 30 minutos de agitación a 0°C, se retiró el baño de hielo y se añadió sulfuro de dimetilo (6.4 µL, 0.09 mmol), seguido de la adición de ácido trifluoroacético (126 µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se añadió a la mezcla de reacción un bicarbonato de sodio acuoso saturado (15 mL) y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con diclorometano (20 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo vítreo se disolvió en DMSO al 50% en acetonitrilo y se purificó por HPLC de fase inversa para obtener (±)-LS72 ((±)-23) con un rendimiento del 61%. Alternativamente, para purificar la mayor cantidad de (±)-LS72, se realizó una cristalización posterior al tratamiento de la mezcla de reacción. Brevemente, al residuo (25 mg) se le añadió acetonitrilo (2 mL) y la mezcla se sonicó brevemente a temperatura ambiente para disolver el residuo. La mezcla se enfrió a 4°C y se mantuvo a esa temperatura durante 2 h, después de lo cual se almacenó durante la noche a -20°C. El sobrenadante se eliminó por filtración y los cristales blancos se lavaron con acetonitrilo enfriado a -20°C. El sobrenadante se recrystalizó de nuevo empleando el procedimiento anterior. La pureza del producto final se verificó por HPLC analítica usando gradiente de acetonitrilo (40% - 95% durante 20 min) en una fase acuosa que contenía 0.05% v/v de ácido trifluoroacético. ¹H NMR (CDCl₃, ppm) δ: 7.19 (d, 4H), 7.07 (d, 4H), 4.39 (d, 2H), 4.30 (d, 2H), 4.04 (d, 2H), 3.59 (d, 2H), 3.21 (s, 6H), 2.96 (s, 6H), 2.86 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, ppm) δ: 166.85, 165.57, 140.65, 131.58, 129.07, 128.81, 75.80, 75.18, 61.21, 37.22, 36.51, 28.59, 27.53. HR-ESIMS: Calculado para C₃₀H₃₄N₄O₆S₄⁺ H⁺: 675.14, [M+H]⁺, encontrado: 675.1401.

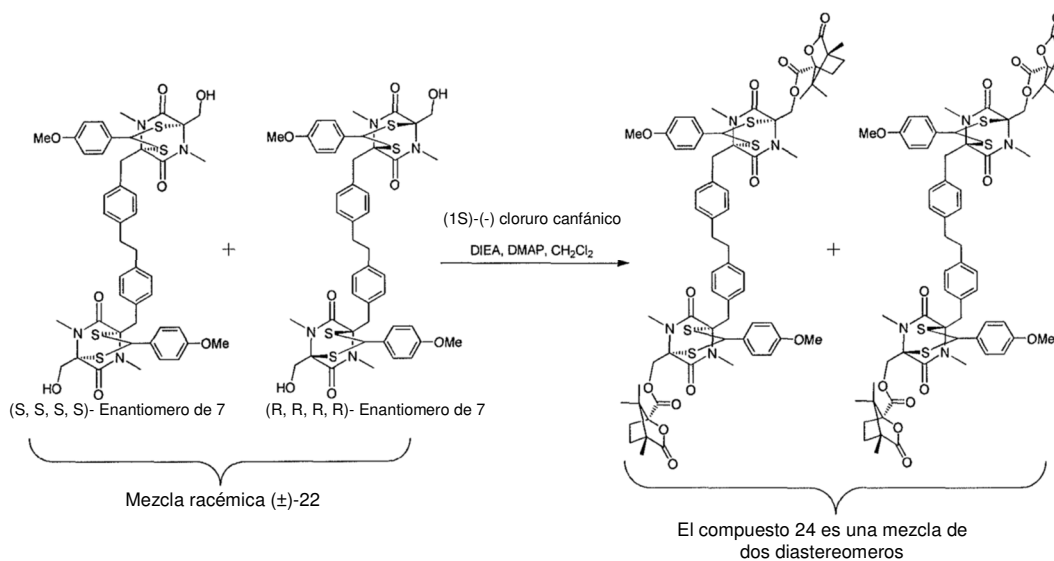
Meso-4,4'-((etano-1,2-diilbis(4,1-fenileno))bis(metileno))bis(1-(hidroximetil))-5,7-dimetil-2,3-ditia-5,7-diazabicyclo[2.2.2]octano-6,8-diona) (meso-LS72, meso-23)



5

Se preparó Meso-LS72 (meso-23) a partir de ditioacetal meso-22 siguiendo el procedimiento análogo al de (±)-7. Rendimiento 60%, ¹H NMR (CDCl₃, ppm) δ: 7.21 (d, 4H), 7.09 (d, 4H), 4.39 (d, 2H), 4.31 (d, 2H), 4.04 (d, 2H), 3.59 (d, 2H), 3.21 (s, 6H), 2.97 (s, 6H), 2.87 (m, 4H). ¹³C NMR (CCl₄, ppm) δ: 166.92, 165.58, 140.73, 131.59, 129.16, 128.77, 75.81, 75.15, 61.26, 37.15, 36.53, 28.61, 27.52. HR-ESIMS: Calculado para C₃₀H₃₄N₄O₆S₄⁺ H⁺: 675.14, [M+H]⁺, Encontrado: 675.1411.

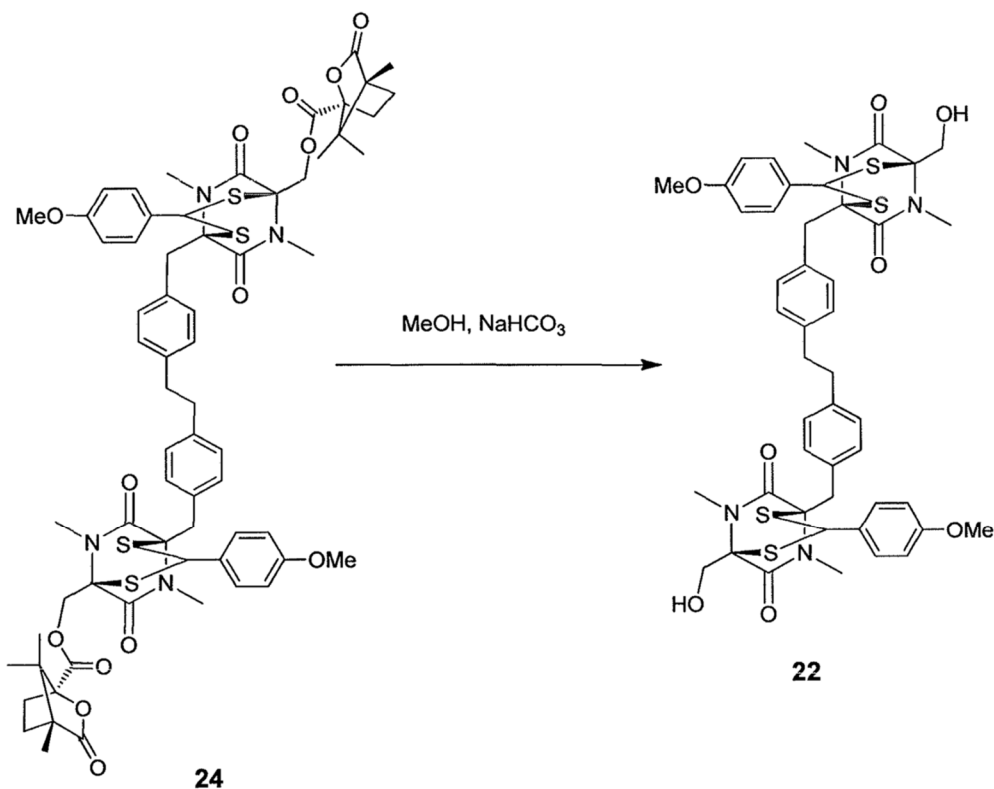
Separación Quiral de (±)-22:



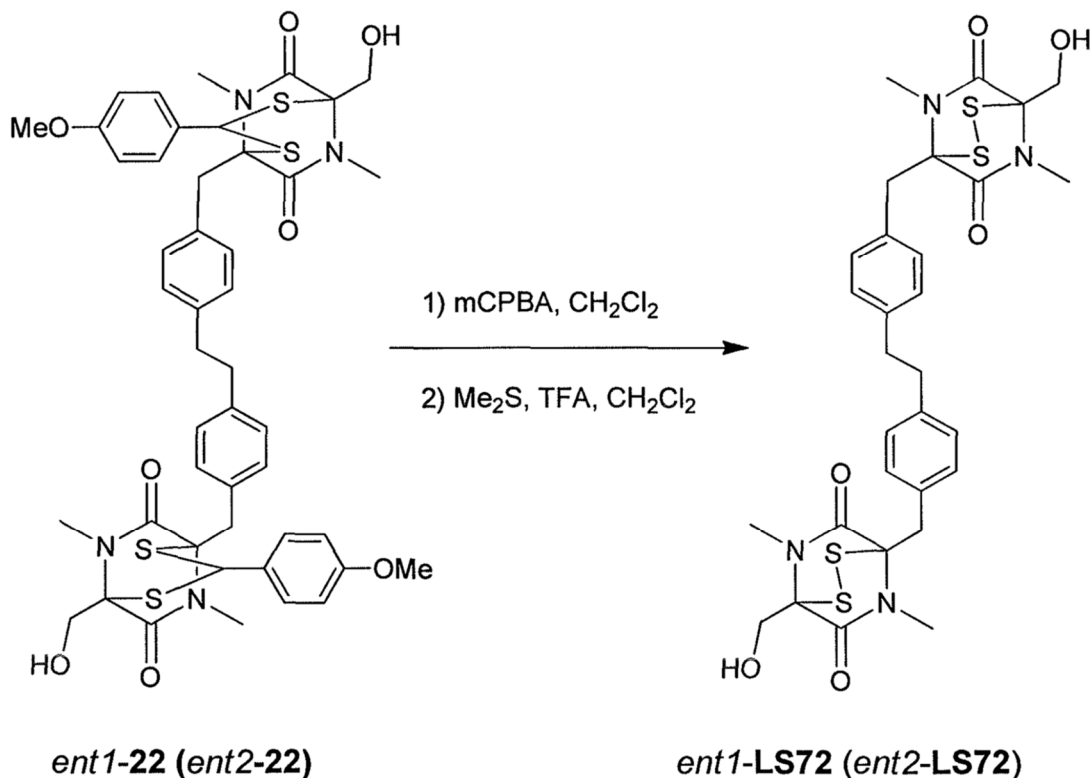
10

Un matraz de fondo redondo se cargó con (±)-22 (20 mg, 0.22 mmol) y 5 mL de diclorometano. A esta mezcla, se añadieron (1S)-(-)-cloruro de canfano (71 mg, 0.3 mmol, 1.4 eq.), 4-dimetilaminopiridina (0.8 mg, 0.007 mmol, 0.03 eq.) y N, N-diisopropiletilamina (150 µL, 0.86 mmol, 3.9 eq.) secuencialmente con agitación. La agitación se mantuvo durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó

con HCl 0.1 M (5 mL) y se secó sobre MgSO_4 anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener 24 en bruto (23 mg, rendimiento total del 83%). Los dos diastereómeros de 24 se separaron por cromatografía en columna usando un sistema de disolvente inicial de 10% de CH_2Cl_2 en hexanos y aumentando gradualmente las cantidades de CH_2Cl_2 y EtOAc al sistema disolvente final de hexanos: EtOAc $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 4:3:3$. Las dos fracciones obtenidas se denominaron dst1-24 (13 mg recuperados) y dst2-24 (10 mg recuperados), respectivamente. Datos del análisis de dst1-24: ^1H NMR (CDCl_3 , ppm) δ : 7.33 (d, 2H), 7.09 (d, 2H), 7.00 (d, 2H), 6.87 (d, 2H), 5.31 (d, 1H), 5.11 (s, 1H), 4.42 (d, 1H), 4.36 (d, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 3.08 (d, 1H), 2.88 (s, 3H), 2.83 (br, 2), 2.40 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 1.89 (m, 1H), 1.68 (m, 1H), 1.09 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.81 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , ppm) δ : 177.78, 166.42, 165.86, 164.81, 160.94, 140.68, 132.58, 130.79, 129.03, 128.42, 126.10, 114.69, 91.01, 73.54, 70.13, 63.05, 55.62, 55.10, 54.62, 51.83, 40.28, 37.53, 30.90, 29.87, 28.92, 28.47, 16.77, 16.67, 10.05. Datos del análisis de dst2-24: ^1H NMR (CDCl_3 , ppm) δ : 7.33 (d, 2H), 7.09 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 6.87 (d, 2H), 5.28 (d, 1H), 5.10 (s, 1H), 4.43 (d, 1H), 4.35 (d, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.12 (d, 1H), 2.93 (s, 3H), 2.84 (br, 2), 2.33 (m, 1H), 2.05 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.10 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.91 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , ppm) δ : 178.12, 166.16, 165.89, 164.74, 160.96, 140.57, 132.73, 130.78, 128.90, 128.42, 126.21, 114.70, 90.87, 73.46, 70.03, 63.16, 55.61, 54.95, 54.47, 51.76, 40.19, 37.44, 30.97, 29.92, 29.19, 28.39, 16.74, 16.64, 9.96.

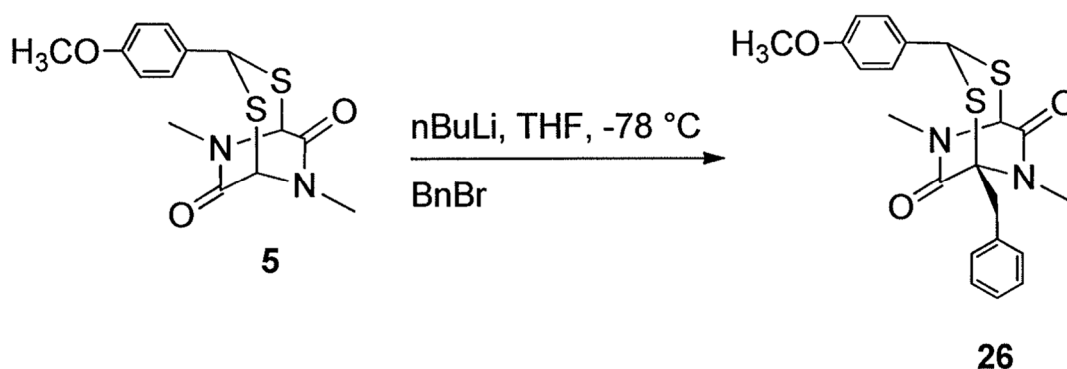


A 10 mg de cada diastereómero de 24, se añadió 1 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio en metanol. La reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. La reacción se purificó inicialmente por columna corta de gel de sílice seguido de purificación en HPLC de fase inversa. Cada una de las reacciones de los dos diastereómeros produjo dos enantiómeros ent1-22 o ent2-22 (6 mg de cada enantiómero recuperados, 74%). Los espectros de CD confirmaron la relación enantiomérica de los dos productos.



Cada ent1-LS72 y ent2-LS72 se obtuvieron con un rendimiento del 61% a partir de los ditionoacetales ent1-22 y ent2-22 siguiendo el procedimiento análogo al de (±)-22. Como se esperaba, los datos de NMR para ent1-LS72 y ent2-LS72 y la mezcla racémica fueron idénticos. Ent1-ETP2 ¹H NMR (CDCl₃, ppm) δ: 7.19 (d, 4H), 7.07 (d, 4H), 4.39 (d, 2H), 4.30 (d, 2H), 4.04 (d, 2H), 3.59 (d, 2H), 3.21 (s, 6H), 2.96 (s, 6H), 2.86 (m, 4H). Ent1-LS72 Calculado para C₃₀H₃₄N₄O₆S₄⁺ H⁺: 675.1416 [M+H]⁺, Encontrado: 675.1416. ent2-LS72 Calculado para C₃₀H₃₄N₄O₆S₄⁺ H⁺: 675.14, [M+H]⁺, Encontrado: 675.1316. Los espectros de CD para ent1-LS72 y ent2-LS72 confirmaron la relación enantiomérica.

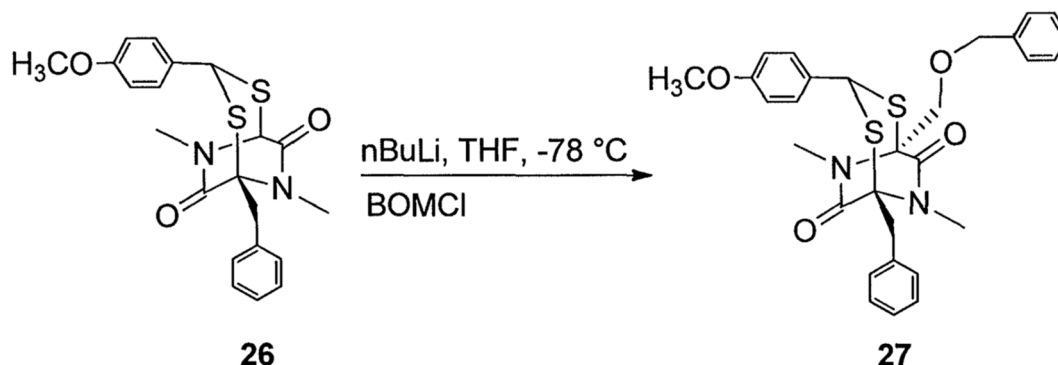
Preparación de 3-(4-metoxifenil)-6,8-dimetil-1-(fenilmetil)2,4-ditia-6,8-diazabicyclo[3.2.2]nonano-7,9-diona (26)



Se disolvió tioacetal 5 (194 mg, 0.6 mmol, 1 eq.) en THF anhidro (25 mL) y la solución se enfrió a -78°C. A la solución agitada se añadió 1.54 M de n-butilitio en hexano (545 µL, 0.84 mmol, 1.4 eq.) gota a gota durante un período de 1 minuto. Después de 30 segundos, se añadió bromuro de bencilo (356 µL, 513 mg, 3 mmol, 5 eq) a la mezcla agitada durante un período de 30 segundos. Después de agitar la mezcla durante 8 minutos a -78°C, la solución roja turbia resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó. Tardó alrededor de 30 min. El TLC muestra un producto principal y un poco (~ 5%) de material de partida. Se añadió una solución saturada de NaCl a la mezcla de reacción y la solución se extrajo con diclorometano. La solución orgánica se lavó con agua dos veces, se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío. El residuo oleoso se trató con hexano. Una parte del material se volvió sólido y se eliminó la solución de hexano. El sólido amarillo se lavó de nuevo con hexano y se secó al vacío. El material bruto sólido se disolvió en

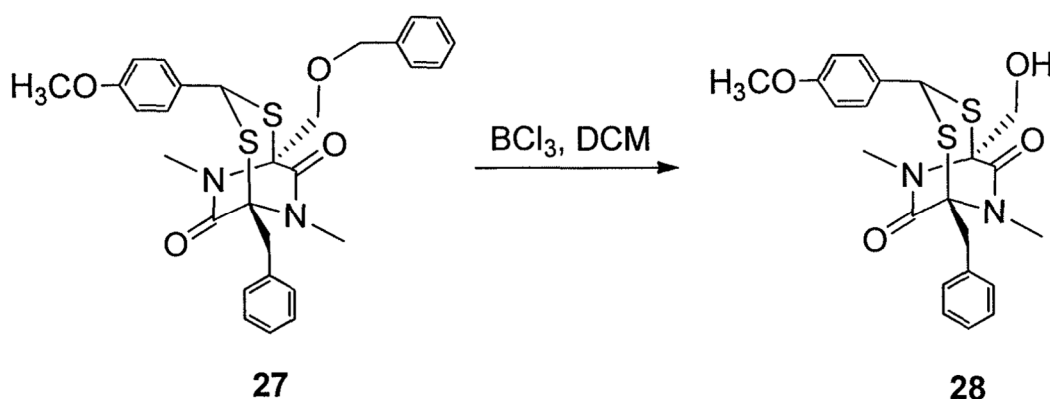
diclorometano (2 mL), se añadió metanol (4 mL) y hexano (aproximadamente 20 mL). El precipitado blanco se separó por filtración para dar 100 mg de 26 (40,8%) del producto puro. ^1H NMR (CDCl_3 , TMS, ppm) δ : 7,36 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7,24 (m, 5H), 6,88 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5,19 (s, 1H) 5,10 (s, 1H), 4,15 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,25 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 3,15 (s, 3H), 3,11 (s, 1H).

5 *Preparación de 3-(4-metoxifenil)-6,8 dimetil-1-[(fenilmetoxi)metil]5-(fenilmetil)-2,4-ditia-6,8-diazabicyclo [3.2.2]nonano-7,9-diona (27)*



10 Cristalina 26 (144 mg, 0.35 mmol, 1 eq) y fenil clorometil éter (500 μL , 455 mg, 1.75 mmol, 5 eq., 60% de reactivo solamente) se disolvieron en THF anhidro (40 mL). La solución se enfrió a -78°C y a la mezcla agitada se añadió gota a gota 1.54 M de n-butilio en hexano (1.16 mL, 1.8 mmol, 1.5 eq) durante un período de 5 min. Después de agitar la mezcla durante 10 minutos a -78°C , la solución roja turbia resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó. Se añadió una solución saturada de NaCl a la mezcla de reacción y la solución roja se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua dos veces, se secó bajo MgSO_4 y se concentró al vacío. El jarabe se separó en columna (hexano-acetato de etilo, 8-2, Rf 0.4) para dar 114 mg de 27 como un sólido de tipo vidrio (62%). ^1H NMR (CDCl_3 , TMS, ppm) δ : 7.35 (m, 5H), 7.28 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.02 (s, 1H), 4.72 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.58 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.51 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 4.20 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.74 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 3.25 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H), 3.19 (s, 3H), 3.15 (s, 3H). FAB-MS: Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$: 534.1, $[\text{M}+\text{H}]^+$, Encontrado: 535.0.

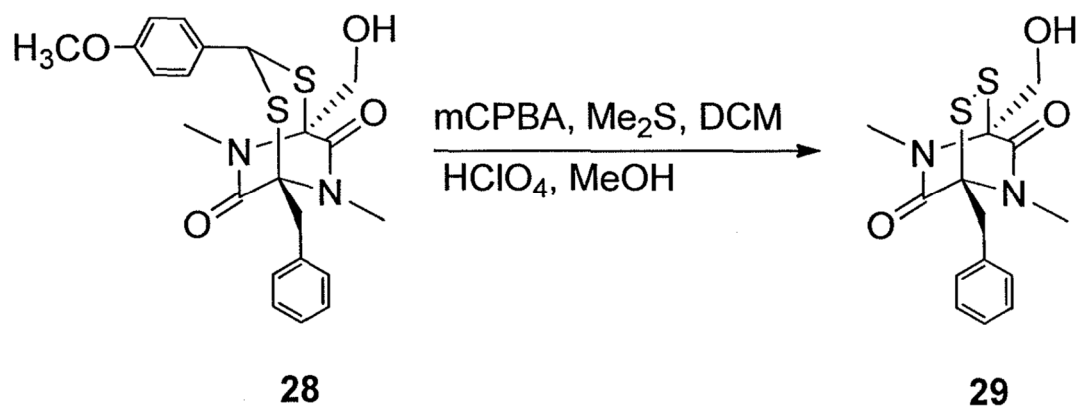
20 *Preparación de 3-(4-metoxifenil)-6,8 dimetil-1-hidroximetil-5-(fenilmetil)-2,4-ditia-6,8-diazabicyclo[3.2.2]nonano-7,9-diona (28)*



25 La solución de 28 (60 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) En diclorometano anhidro (15 mL) se enfrió a 0°C . A esta mezcla de reacción agitada se añadió tricloruro de boro 1M en diclorometano (200 μL , 0.2 mmol, 1.8 eq.) Gota a gota durante un período de 30 segundos. La solución se dejó agitar a 0°C durante 10 min. y a continuación se vertió en agua con hielo. La fase acuosa se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó bajo MgSO_4 y se concentró al vacío para obtener 38 mg de producto en bruto. El sólido vítreo se purificó en columna con una mezcla de diclorometano-EtOAc (65-35, Rf 0.35), para dar 28 mg de 28 puro (57% de rendimiento). ^1H NMR (CDCl_3 , TMS, ppm) δ : 7.35-7.14 (m, 7H), 6.86 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 5.04 (s, 1H), 4.66 (dd, $J = 5.1$ y 12.5 Hz, 1H), 4.24 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 3.87 (dd, $J = 9.5$ y 12.8 Hz,

1H), 3.80 (s, 3H), 3.25 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 3.24 (s, 3H), 3.14 (s, 3H) 2.73 (dd, J = 5.7 y 9.7 Hz, 1H). FAB-MS: Calculado para C₂₂H₂₄N₂O₄S₂: 444.1, [M+H]⁺, Encontrado: 444,9.

Preparación de 1,4-dimetil-3-hidroximetil-6-fenilmetil-2,5-piperazindiona-3,6-disulfuro (29)



- 5 La solución de 28 (25 mg, 0.056 mmol, 1 eq.) En diclorometano anhidro (15 mL) se enfrió a 0°C. A esto, se añadió una solución agitada en ácido cloroperbenzoico (15 mg, 0.0672 mmol, 1.2 eq, máximo 77% puro). Después de 10 minutos de agitación a 0°C, se añadió sulfuro de dimetilo (20 µL). La solución se trató a continuación con 25 µL de ácido perclórico en metanol (1:5). La solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 9 horas y seguidamente se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio. La
- 10 capa acuosa se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó bajo MgSO₄ y se concentró al vacío para obtener 10 mg de producto bruto. El sólido vítreo se purificó en columna con una mezcla de diclorometano-EtOAc (97,5-2,5, R_f 0.3) para dar 4 mg de 29 (22% de rendimiento). ¹H NMR (CCl₃, TMS, ppm) δ = 7.30 (m, 5H), 4.34 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.08 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 3.65 (d, J = 13.0 Hz, 1H), 3.50 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 3.22 (s, 3H), 3.00 (s, 3H).

15 Evaluación de la Actividad in vitro de ETP Sintéticos

Se utilizaron tres tipos de ensayos biológicos para evaluar la eficacia de los compuestos en cultivos celulares: 1) ensayos basados en luciferasa para medir la actividad del promotor inducible de HIF1; 2) medición de los niveles de ARN mensajero de los genes endógenos mediante la reacción en cadena inversa cuantitativa de la polimerasa con transcriptasa; y 3) análisis de los niveles de VEGF y de la proteína c-Met mediante análisis de transferencia Western.

Los inventores utilizaron estos ensayos para evaluar los niveles relativos de expresión génica en tres líneas celulares humanas: HeLa (adenocarcinoma epitelial cervical humano), MCF7 (carcinoma de mama humano benigno) y MDA-MB-231 (carcinoma de mama maligno) se trataron con el título compuestos ETP, DKP NP481 control y CTM quetomina. En paralelo, las células no tratadas se utilizaron como controles. Los

25 experimentos de luciferasa y ELISA se llevaron a cabo por triplicado, y los experimentos de RT-PCR se repitieron seis veces.

Ensayos de luciferasa. Se mantuvieron células MDA-MB-231-hRE-Luc en medio de Eagle modificado con Dulbecco de alta glucosa (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10% y Geneticina 0.4 g/L (sulfato de G418, RPI Corporation). Las células se plaquearon en placas de 24 pocillos (BD Falcon) a una

30 densidad de 6 x 10⁴ células/pocillo utilizando 1 mL de una suspensión de 6,5 x 10⁴ células/mL. Una vez producida la unión, las células se trataron con 1 mL de medio fresco que contenía compuestos ETP sintéticos o quetina en concentraciones que varían de 10 nM a 1 µM. Las células se incubaron durante 6 h a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. La hipoxia se indujo añadiendo mesilato de desferrioxamina (DFO, Sigma) a una concentración final de 300 µM, y las células se incubaron durante 18

35 horas adicionales. El lisado celular completo se aisló lavando las células dos veces con PBS enfriado en hielo y a continuación añadiendo 150 µL de Reactivo de lisis de cultivo celular (CCLR, Promega). El lisado se recogió, se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C, se alicuotó y se almacenó a -80°C. Los ensayos de Luciferasa se llevaron a cabo permitiendo que el lisado de células completas y el Reactivo de Ensayo de Luciferasa (Promega) lleguen a temperatura ambiente durante 1 hora antes de su uso. Los ensayos de luciferasa se

40 realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega) usando un luminómetro Turner TD-20e. Las mediciones de intensidad de luz relativa se normalizaron realizando un ensayo de Bradford para determinar el contenido de proteína del lisado utilizado en el ensayo de luciferasa. Brevemente, se

añadieron 50 µL de mezcla de reactivo de ensayo de luciferasa de lisado celular a 200 µL de reactivo Bradford y 750 µL de agua Millipore en una cubeta de 1.5 mL. Se crearon estándares de proteína en el rango de 1 µg/mL a 10 µg/mL usando una cantidad apropiada de una solución de BSA de 1 mg/mL. La absorbancia se midió a 595 nm usando un espectrofotómetro DU-800. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados se presentan en la Figura 6 con los gráficos de barras que representan los valores medios y las barras de error, error estándar del valor medio.

Cultivo celular y aislamiento de ARNm

Las células HeLa se mantuvieron en medio de Eagle modificado con Dulbecco de alta glucosa (DMEM, Sigma) complementado con suero bovino fetal al 8% (Irvine Scientific) de acuerdo con el procedimiento publicado.⁶⁹ Las células se plaquearon en placas de 6 pocillos (BD Falcon) a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/pocillo usando 2 mL de una suspensión de 6×10^4 células/mL. Una vez producida la unión, las células se trataron con 1 mL de medio fresco que contenía compuestos ETP sintéticos o quetomina en concentraciones que varían de 10 nM a 1 µM. Después de un período de incubación de 6 h a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, se indujo hipoxia añadiendo mesilato de desferrioxamina (DFO, Sigma) a una concentración final de 300 µM e incubando las células durante otras 18 horas. Las células se lavaron dos veces con PBS helado y se lisaron inmediatamente. El ARN total se aisló con el kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cuantificó mediante absorbancia de UV. El ARN aislado se trató adicionalmente con DNasa I (kit Ambion, DNase) para eliminar cualquier ADN genómico restante. La transcripción inversa se realizó con Powerscript II Reverse Transcriptase (Clontech) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Las células MCF7 se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Irvine Scientific). Las células se plaquearon en placas de 6 pocillos a una densidad de $2,4 \times 10^5$ células/pocillo usando 2 mL de una suspensión de $1,2 \times 10^5$ células/mL. Una vez producida la unión, las células se trataron con 1 mL de medio fresco que contenía compuestos ETP sintéticos o quetomina en concentraciones que varían de 10 nM a 1 µM. Después de un período de incubación de 6 h a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%, se indujo hipoxia añadiendo mesilato de desferrioxamina (DFO, Sigma) a una concentración final de 300 µM e incubando las células durante otras 18 horas. Las células se lavaron dos veces con PBS helado y se lisaron inmediatamente. El ARN total se aisló con el kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cuantificó mediante absorbancia UV. El ARN aislado se trató adicionalmente con DNasa I (Ambion, kit sin ADN) para eliminar cualquier ADN genómico restante. La transcripción inversa se realizó con Powerscript II Reverse Transcriptase (Clontech) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Análisis de la expresión génica con micromatrices affymetrix. Se utilizó PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) para determinar el efecto de los compuestos ETP sobre los genes VEGF y GLUT1 en células HeLa tanto en condiciones normóxicas como hipóxicas. Para el análisis de VEGF, el cebador directo 5'-AGG CCA GCA CAT AGG AGA GA-3' y el cebador inverso 5'-TTT CCC TTT CCT CGA ACT GA-3' se utilizaron para amplificar un fragmento de 104-bp de la región 3'- traducida del gen. Para el análisis GLUT1 (SLC2A1) se utilizaron las siguientes secuencias para obtener un producto de 179 bp: secuencia directa 5'-TAG AAA CAT GGT TTT GAA ATG C-3' secuencia inversa 5'-GGT AAC AGG GAT CAA ACA GAT T-3'. Los niveles de ARN se estandarizaron mediante la cuantificación de la *β-glucuronidasa* como gen de mantenimiento. Para este gen se utilizaron el cebador directo 5'-CTC ATT TGG AAT TTT GCC GAT T-3' y el cebador inverso 5'-CCG AGT GAA GAT CCC CTT TTT A-3'. El experimento se realizó con la mezcla maestra SYBR Green RT-PCR de Applied Biosystems. El ciclo de temperatura y la detección de la emisión verde de SYBR se realizaron con un instrumento de PCR en tiempo real ABI 7300. Los datos se analizaron con el Sistema de Detección de Secuencias de Applied Biosystems, versión 1.2. El análisis estadístico se realizó con los datos de seis experimentos independientes.

Análisis Western blot de los niveles de proteína VEGF y c-Met. Las células MCF7 y MDA-MB-231 se sembraron en placas de cultivo celular de 60 mm de diámetro (BD Falcon) hasta una densidad de $1,0 \times 10^6$ células/mL. Después de la unión, se trataron con medios que contienen quetomina (200 nM), LS72 y LS75 (400 nM). Todas las muestras contenían una concentración final de 0.1-0.2% v/v de DMSO. Después de un período de incubación de 6 horas, se indujo hipoxia con 300 µM de DFO en MCF7 y con 150 µM de CoCl₂ en células MDA-MB-231. Las muestras se incubaron durante 18 horas adicionales. Las proteínas celulares totales se extrajeron de las células usando tampón de lisis celular de acuerdo con el protocolo del fabricante (Cell Signaling). Las concentraciones de proteína se midieron con el kit de ensayo BCA Protein (Pierce/Thermo Scientific). Se sometieron cantidades iguales de muestras de proteínas a SDS-PAGE y se electrotransferieron a membrana de PVDF (Bio-Rad). Estos se probaron primero con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-VEGF (sc-57496, Santa Cruz Biotechnology) o anti c-Met de conejo policlonal (sc-10, Santa Cruz Biotechnology), raspado con Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce/Thermo Scientific) y se volvió a explorar con un anticuerpo policlonal de conejo anti-actina (4867, Cell Signaling).

Después de lavar con solución salina tamponada con tris - solución Tween 20 (TBST), las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) (Santa Cruz Biotechnology). Las señales se detectaron mediante el uso del kit quimioluminiscente SuperSignal (Pierce/Thermo Scientific).

- 5 Uso animal Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las pautas federales después de la revisión y aprobación por parte del Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal de PRISM. (IACUC). Se compraron ratones atímicos desnudos comprados a Harlan a la edad de 8-9 semanas.

- 10 Líneas celulares de tumores fluorescentes. N202 (regalo de Joseph Lustgarten, Mayo Clinic, Scottsdale, AZ) se mantuvieron en Glucosa DMEM High complementado con L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 U/ml), piruvato de sodio (1 mM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 10% de FBS inactivado por calor (Omega Scientific, Tarzana, CA) a 37°C en 5% de CO₂ en el aire. La histona H2B-GFP se subclonó en los sitios Sall/HpaI en el vector LXRN (Clontech, Palo Alto, CA) utilizando Sail y los sitios NotI romos del vector BOSH2BGFPN1⁷⁰, N202 se transdujeron con el virus viable para incorporar de forma estable el gen H2B-GFP.

- 15 Las células transducidas fueron clasificadas por FAC dos veces para asegurar que el 100% de las células expresaban de manera estable la proteína H2B-GFP.

- 20 Modelos de tumor de xenoinjerto de ratón. El modelo clásico de tumor IVM⁷¹ se utilizó con modificaciones menores. Los ratones, generalmente ratones desnudos atímicos (25-30 g de peso corporal), se anestesiaron (7.3 mg de hidrocloreuro de ketamina y 2.3 mg de xilazina por 100 g de peso corporal, inyección intraperitoneal) y se colocaron en una almohadilla térmica. Se colocó un marco de titanio en el pliegue cutáneo dorsal de los ratones para intercalar la doble capa de piel extendida. A continuación, se extirpó una capa circular de piel de espesor completo de 15 mm de diámetro. La fascia superficial en la parte superior de la piel restante se retira cuidadosamente para exponer el tejido muscular subyacente y el tejido subcutáneo que luego se cubre con otro marco de titanio con un cubreobjetos de vidrio para formar la cámara de la ventana. Después de un período de recuperación de 1-2 días, se implantaron esferoides tumorales. Los esferoides tumorales se formaron plaqueando 50,000 células de N202 en 96 placas de fondo plano tratadas con cultivo no de tejido revestidas con agar (20 µl de células en 100 µl de medio) y centrifugando 4 veces a 2000 rpm durante 15 min, rotando el plato después de cada centrifugado. Las células se incubaron durante 3-7 días adicionales (dependiendo del tipo de célula) a 37°C en CO₂ al 5% en aire para formar esferoides tensos. Los esferoides tumorales se implantaron directamente en la piel dorsal solo en la cámara de la ventana. Se dejó que los tumores se vascularizaran durante 10-14 días antes de la inyección de 1 mg/kg de compuesto LS72 en el Día 0, seguido de la administración diaria a 2 mg/kg en los Días 8-13.

- 35 Crecimiento tumoral Análisis del crecimiento tumoral con IVM. Los tumores fueron fotografiados por microscopía de fluorescencia intravital, tal como se describe.⁷² El crecimiento tumoral se analizó fuera de línea a partir de las imágenes registradas, digitales, en escala de grises de 0 a 256 imágenes utilizando Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Bethesda, MD). El crecimiento tumoral se determinó cuantificando la señal de fluorescencia acumulativa para el tumor a lo largo del tiempo. La señal de fluorescencia tumoral acumulativa se midió mediante la suma de la señal de todos los píxeles por encima de 75. Todas las curvas de crecimiento se normalizan al tumor el día 0 después del tratamiento.
- 40

Tabla 1		
<u>Símbolo</u>	<u>ID Gen Entrez</u>	<u>LS72</u>
TGFB3	7043	-1.5
TFRC	7037	-1.5
LOXL2	4017	-1.4
CAV1	857	-1.3
MET	4233	-2.2
SLC35D1	23169	-3.1

Lista de genes HIF1 α inducibles importantes que se regulan negativamente bajo inducción hipóxica con DFO (300 μ M) mediante tratamiento con LS72 (400 nM).

Tabla 2		
<u>Símbolo</u>	<u>ID Gen Entrez</u>	<u>LS72</u>
SLC35D1	23169	-3.1
SLC5A8	160728	-1.4
SLC25A15	10166	-1.5
SLC9A3R1	9368	-1.6
SLC39A11	201266	-1.9
SLC9A2	6549	-1.8
SLC5A6	8884	-2.4
SLC25A2	8604	-1.8
SLC26A2	1836	-1.4
SLC38A9	153129	-1.5
SLC35A1	10559	-2.2
SLC7A2	6542	-2.5
SLC27A4	10999	-1.4

Lista de genes de la familia de portadores de soluto (SLC) que están regulados negativamente en células MCF7 bajo inducción hipóxica con DFO (300 μ M) tras el tratamiento con LS72 (400 nM).

REFERENCIAS

1. Semenza, G. L. (2007) Hypoxia and cancer *Cancer Metastasis Rev.* 26, 223-+
2. Gatenby, R. A., and Gillies, R. J. (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4, 891-899
3. Gatenby, R. A., Gawlinski, E. T., Gmitro, A. F., Kaylor, B., and Gillies, R. J. (2006) Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study *Cancer Res.* 66, 5216-5223
4. Lum, J. J., Bui, T., Gruber, M., Gordan, J. D., DeBerardinis, R. J., Covello, K. L., Simon, M. C., and Thompson, C. B. (2007) The transcription factor HIF-1 α plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis *Genes Dev.* 21, 1037-1049
5. Kim, J. W., and Dang, C. V. (2006) Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect *Cancer Res.* 66, 8927-8930
6. Gillies, R. J., and Gatenby, R. A. (2007) Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis *Cancer Metastasis Rev.* 26, 311-317
7. Brown, J. M., and Wilson, W. R. (2004) Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment 4, 437-447
8. Vaupel, P., Schlenger, K., Knoop, C., and Höckel, M. (1991) Oxygenation of Human Tumors: Evaluation of Tissue Oxygen Distribution in Breast Cancers by Computerized O₂ Tension Measurements 51, 3316-3322
9. Tannock, I. F. (1968) RELATION BETWEEN CELL PROLIFERATION AND VASCULAR SYSTEM IN A TRANSPLANTED MOUSE MAMMARY TUMOUR *Br. J. Cancer* 22, 258-&
10. Comerford, K. M., Wallace, T. J., Karhausen, J., Louis, N. A., Montalto, M. C., and Colgan, S. P. (2002) Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene *Cancer Res.* 62, 3387-3394
11. Wartenberg, M., Ling, F. C., Muschen, M., Klein, F., Acker, H., Gassmann, M., Petrat, K., Putz, V., Hescheler, J., and Sauer, H. (2003) Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor-1 and reactive oxygen species *Faseb J.* 17, 503-+
12. Durand, R. E. (1994) The influence of microenvironmental factors during cancer therapy 8, 691-702
13. Tannock, I. F. (1998) Conventional cancer therapy: promise broken or promise delayed? 351, SII9-SII16
14. Harris, A. L. (2002) Hypoxia - A key regulatory factor in tumour growth *Nat. Rev. Cancer* 2, 38-47
15. Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S., and Comoglio, P. M. (2003) Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene *Cancer Cell* 3, 347-361
16. Graeber, T. G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D. E., Koch, C. J., Lowe, S. W., and Giaccia, A. J. (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours *Nature* 379, 88-91
17. Semenza, G. L. (2001) Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology *Trends Mol. Med* 7, 345-350
18. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H. F., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin, W. G. (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O₂ sensing *Science* 292, 464-468
19. Kaelin, W. G. (2002) Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome *Nat. Rev. Cancer* 2, 673-682
20. Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., and Ratcliffe, P. J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis *Nature* 399, 271-275
21. Wood, S. M., Gleadle, J. M., Pugh, C. W., Hankinson, O., and Ratcliffe, P. J. (1996) The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression - Studies in ARNT-deficient cells *J. Biol. Chem.* 271, 15117-15123
22. O'Rourke, J. F., Dachs, G. U., Gleadle, J. M., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Stratford, I. J., Wood, S. M., and Ratcliffe, P. J. (1997) Hypoxia response elements *Oncol. Res.* 9, 327-332
23. Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., and Semenza, G. L. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1 *Mol. Cell. Biol.* 16, 4604-4613
24. Okino, S. T., Chichester, C. H., and Whitlock, J. P. (1998) Hypoxia-inducible mammalian gene expression analyzed *in vivo* at a TATA-driven promoter and at an initiator-driven promoter *J. Biol. Chem.* 273, 23837-23843
25. Lando, D., Pongratz, I., Poellingers, L., and Whitelaw, M. L. (2000) A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α and the HIF-like factor *J. Biol. Chem.* 275, 4618-4627
26. Lando, D., Gorman, J. J., Whitelaw, M. L., and Peet, D. J. (2003) Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation *Eur. J. Biochem.* 270, 781-790

27. Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L., and Bruick, R. K. (2002) FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor *Genes Dev.* 16, 1466-1471
28. Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J., and Whitelaw, M. L. (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: A hypoxic switch *Science* 295, 858-861
29. Hewitson, K. S., McNeill, L. A., Riordan, M. V., Tian, Y. M., Bullock, A. N., Welford, R. W., Elkins, J. M., Oldham, N. J., Bhattacharya, S., Gleadle, J. M., Ratcliffe, P. J., Pugh, C. W., and Schofield, C. J. (2002) Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family *J. Biol. Chem.* 277, 26351-26355
30. Metzzen, E., and Ratcliffe, P. J. (2004) HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing *Biol. Chem.* 385, 223-230
31. Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., Bunn, H. F., and Livingston, D. M. (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 12969-12973
32. Vleugel, M. M., Shvarts, D., van der Wall, E., and van Diest, P. J. (2006) p300 and p53 levels determine activation of HIF-1 downstream targets in invasive breast cancer *Hum. Pathol.* 37, 1085-1092
33. Kasper, L. H., Boussouar, F., Boyd, K., Xu, W., Biesen, M., Rehg, J., Baudino, T. A., Cleveland, J. L., and Brindle, P. K. (2005) Two transactivation mechanisms cooperate for the bulk of HIF-1-responsive gene expression *Embo J.* 24, 3846-3858
34. Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., and Poellinger, L. (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 alpha *Embo J.* 17, 6573-6586
35. Ebert, B. L., and Bunn, H. F. (1998) Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein *Mol. Cell. Biol.* 18, 4089-4096
36. Kobayashi, A., NumayamaTsuruta, K., Sogawa, K., and FujiiKuriyama, Y. (1997) CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt) *J. Biochem. (Tokyo)* 122, 703-710
37. Giaccia, A., Siim, B. G., and Johnson, R. S. (2003) HIF-1 as a target for drug development *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 803-811
38. Sun, X., Kanwar, J. R., Leung, E., Lehnert, K., Wang, D., and Krissansen, G. W. (2001) Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 alpha enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy *Gene Ther.* 8, 638-645
39. Mabeesh, N. J., Escuin, D., LaVallee, T. M., Pribluda, V. S., Swartz, G. M., Johnson, M. S., Willard, M. T., Zhong, H., Simons, J. W., and Giannakakou, P. (2003) 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF *Cancer Cell* 3, 363-375
40. Eid, J. E., Kung, A. L., Scully, R., and Livingston, D. M. (2000) P300 interacts with the nuclear proto-oncoprotein SYT as part of the active control of cell adhesion *Cell* 102, 839-848
41. Hirota, K., and Semenza, G. L. (2006) Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1 *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 59, 15-26
42. Ramanathan, A., Wang, C., and Schreiber, S. L. (2005) Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5992-5997
43. Underiner, T. L., Ruggeri, B., and Gingrich, D. E. (2004) Development of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) kinase inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy *Curr. Med. Chem.* 11, 731-745
44. Kung, A. L., Zabudoff, S. D., France, D. S., Freedman, S. J., Tanner, E. A., Vieira, A., Cornell-Kennon, S., Lee, J., Wang, B. Q., Wang, J. M., Memmert, K., Naegeli, H. U., Petersen, F., Eck, M. J., Bair, K. W., Wood, A. W., and Livingston, D. M. (2004) Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway *Cancer Cell* 6, 33-43
45. Foster, B. A., Coffey, H. A., Morin, M. J., and Rastinejad, F. (1999) Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function *Science* 286, 2507-2510
46. Arkin, M. R., and Wells, J. A. (2004) Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: Progressing towards the dream *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 301-317
47. Issaeva, N., Bozko, P., Enge, M., Protopopova, M., Verhoef, L., Masucci, M., Pramanik, A., and Selivanova, G. (2004) Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors *Nat. Med.* 10, 1321-1328
48. Lepourcelet, M., Chen, Y. N. P., France, D. S., Wang, H. S., Crews, P., Petersen, F., Bruseo, C., Wood, A. W., and Shivdasani, R. A. (2004) Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein

complex Cancer Cell 5, 91-102

49. Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N., and Liu, E. A. (2004) *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2 Science 303, 844-848

50. Grasberger, B. L., Lu, T. B., Schubert, C., Parks, D. J., Carver, T. E., Koblisch, H. K., Cummings, M. D., LaFrance, L. V., Milkiewicz, K. L., Calvo, R. R., Maguire, D., Lattanze, J., Franks, C. F., Zhao, S. Y., Ramachandren, K., Bylebyl, G. R., Zhang, M., Manthey, C. L., Petrella, E. C., Pantoliano, M. W., Deckman, I. C., Spurlino, J. C., Maroney, A. C., Tomczuk, B. E., Molloy, C. J., and Bone, R. F. (2005) Discovery and cocrystal structure of benzodiazepinedione HDM2 antagonists that activate p53 in cells J. Med. Chem. 48, 909-912

51. Ang, S. O., Chen, H., Hirota, K., Gordeuk, V. R., Jelinek, J., Guan, Y. L., Liu, E. L., Sergueeva, A. I., Miasnikova, G. Y., Mole, D., Maxwell, P. H., Stockton, D. W., Semenza, G. L., and Prchal, J. T. (2002) Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia Nature Genet. 32, 614-621

52. Berg, T., Cohen, S. B., Desharnais, J., Sonderegger, C., Maslyar, D. J., Goldberg, J., Boger, D. L., and Vogt, P. K. (2002) Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 3830-3835

53. De Munari, S., Grugni, M., Menta, E., Cassin, M., and Colella, G. (2006) Use Of Diketodithiopiperazine Antibiotics For The Preparation Of Antiangiogenic Pharmaceutical Compositions .

54. Hauser, D., Weber, H. P., and Sigg, H. P. (1970) Isolation and Structure Elucidation of Quetocina Helv. Chim. Acta 53, 1061-&

55. Waksman, S. A., and Bugie, E. (1944) Chaetomin, a new antibiotic substance produced by chaetomium cochliodes I. Formation and properties J. Bacteriol. 48, 527-530

56. Gardiner, D. M., Waring, P., and Howlett, B. J. (2005) The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis Microbiology-(UK) 151, 1021-1032

57. Brewer, D., Archibald, Rm, Safe, S., Taylor, A., Stevenso, Rg, Vining, L. C., Duncan, J. M., Christen, Cm, Mirocha, C. J., Leach, C. K., and Jerram, W. A. (1972) Ovine Ill-Thrift in Nova-Scotia .5. Production and Toxicology of Chetomin, a Metabolite of Chaetomium Spp Can. J. Microbiol. 18, 1129-&

58. Sekita, S., Yoshihira, K., Natori, S., Udagawa, S., Muroi, T., Sugiyama, Y., Kurata, H., and Umeda, M. (1981) Myco-Toxin Production by Chaetomium Spp and Related Fungi Can. J. Microbiol. 27, 766-772

59. Bernardo, P. H., Brasch, N., Chai, C. L. L., and Waring, P. (2003) A novel redox mechanism for the glutathione-dependent reversible uptake of a fungal toxin in cells J. Biol. Chem. 278, 46549-46555

60. Fukuyama, T., Nakatsuka, S., and Kishi, Y. (1981) Total Synthesis of Gliotoxin, Dehydrogliotoxin and Hyalodendrin Tetrahedron 37, 2045-2078

61. Sasaki, K., Fukuyama, T., Nakatsuka, S., and Kishi, Y. (1975) X-Ray Structure Determination of "3,6-P-Anisylidenedithio-3-Ethyl-Nn' Dimethylpiperazine-2,5-Dione J. Chem. Soc.-Chem. Commun., 542-543

62. Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., and Abraham, J. A. (1991) The Human Gene for Vascular Endothelial Growth-Factor - Multiple Protein Forms Are Encoded through Alternative Exon Splicing J. Biol. Chem. 266, 11947-11954

63. Shibata, T., Giaccia, A. J., and Brown, J. M. (2000) Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy Gene Ther. 7, 493-498

64. Block, K. M., Wang, H., Szabo, L. Z., Polaske, N. W., Henchey, L. K., Dubey, R., Kushal, S., Laszlo, C. F., Makhoul, J., Song, Z. H., Meuillet, E. J., and Olenyuk, B. Z. (2009) Direct Inhibition of Hypoxia-Inducible Transcription Factor Complex with Designed Dimeric Epidithiodiketopiperazine J. Am. Chem. Soc. 131, 18078-18088

65. Erler, J. T., Bennewith, K. L., Nicolau, M., Dornhofer, N., Kong, C., Le, Q. T., Chi, J. T. A., Jeffrey, S. S., and Giaccia, A. J. (2006) Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis Nature 440, 1222-1226

66. Darash-Yahana, M., Pikarsky, E., Abramovitch, R., Zeira, E., Pal, B., Karplus, R., Beider, K., Avniel, S., Kasem, S., Galun, E., and Peled, A. (2004) Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis Faseb J. 18, 1240-+

67. Pradervand, S., Paillusson, A., Thomas, J., Weber, J., Wirapati, P., Hagenbuchle, O., and Harshman, K. (2008) Affymetrix Whole-Transcript Human Gene 1.0 ST array is highly concordant with standard 3 ' expression arrays Biotechniques 44, 759-762

68. Affymetrix. (2012). Affymetrix, <http://www.affymetrix.com>

69. Olenyuk, B. Z., Zhang, G. J., Klco, J. M., Nickols, N. G., Kaelin, W. G., and Dervan, P. B. (2004) Inhibition of vascular endothelial growth factor with a sequence-specific hypoxia response element antagonist Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 16768-16773

70. Kanda, T., Sullivan, K. F., and Wahl, G. M. (1998) Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells 8, 377-385

71. Frost, G. I., Lustgarten, J., Dudouet, B., Nyberg, L., Hartley-Asp, B., and Borgstrom, P. (2005) Novel syngeneic pseudo-orthotopic prostate cancer model: vascular, mitotic and apoptotic responses to castration 69, 1-9
- 5 72. Oh, P., Borgstrom, P., Witkiewicz, H., Li, Y., Borgstrom, B. J., Chrastina, A., Iwata, K., Zinn, K. R., Baldwin, R., Testa, J. E., and Schnitzer, J. E. (2007) Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung 25, 327-33.

LISTADO DE SECUENCIA

<110> University of Southern California

<120>Composiciones y Métodos para la Inhibición de la Actividad del Complejo de Factor de Transcripción Inducible por Hipoxia y su Utilización para el Tratamiento de Tumores

<130> P58909

<140> 13832341.5

<141> 2013-03-15

<150> US 61/694717

<151> 2012-08-29

<160> 6

<170> Patente en versión 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótida sintética

<400> 1

aggccagcac ataggagaga 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

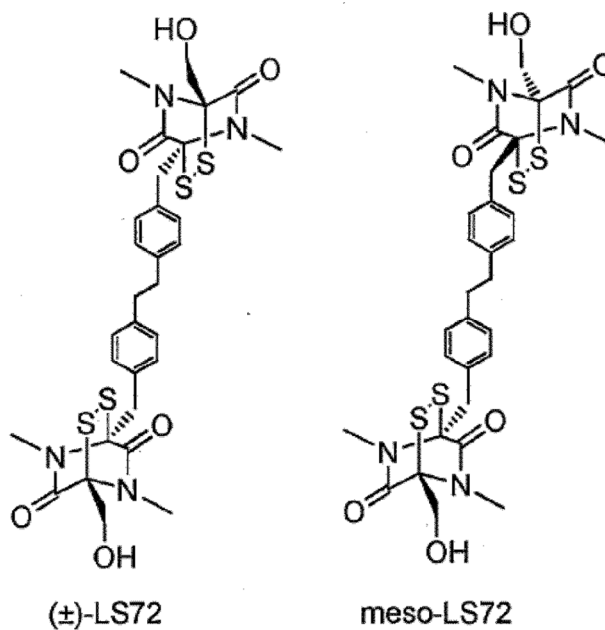
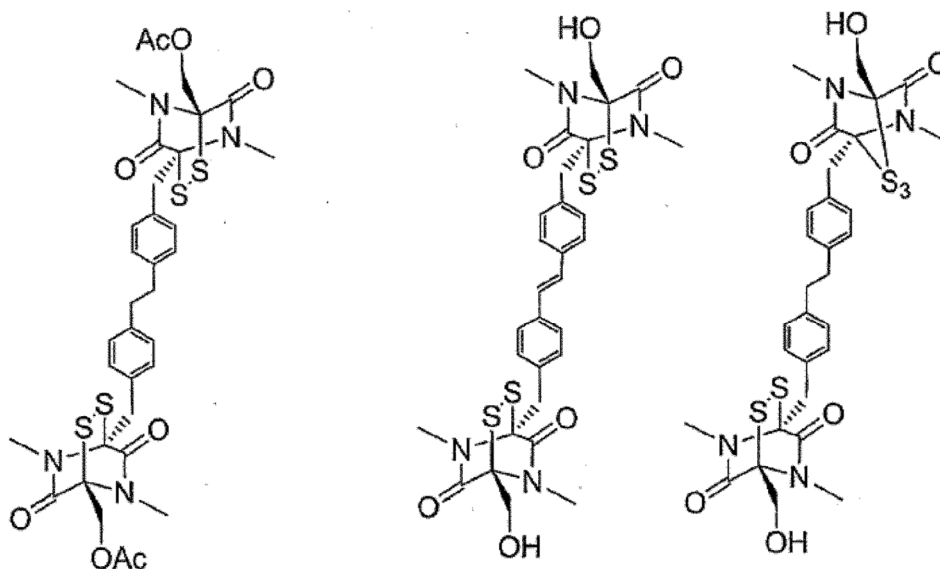
<220>

<223> Oligonucleótida sintética

	<400> 2		
	tttcccttc ctcgaactga	20	
5	<210> 3		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
10	<220>		
	<223> Oligonucleótida sintética		
	<400> 3		
	tagaaacatg gtttgaaat gc	22	
15	<210> 4		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
20	<220>		
	<223> Oligonucleótida sintética		
25	<400> 4		
	ggtaacaggg atcaaacaga tt	22	
	<210> 5		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
30	<220>		
	<223> Oligonucleótida sintética		
35	<400> 5		
	ctcatttgga atttgccga tt	22	
	<210> 6		
	<211> 21		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótida sintética		
45	<400> 6		
	ccgagtgaag atccccttt t	21	

Reivindicaciones

1. Un compuesto seleccionado entre los siguientes:

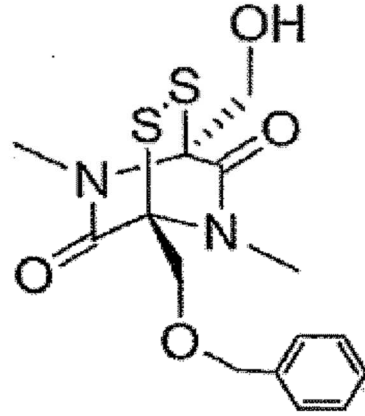
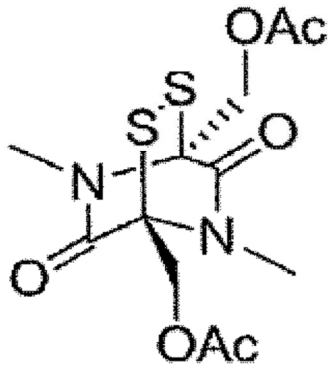


2. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 disuelto o disperso en un soporte.
3. Un método *ex vivo* para interferir con una vía transcripcional inducida por hipoxia en una célula, que comprende hacer contactar la célula con al menos un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.
4. Al menos un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su utilización en un método para el tratamiento de

5

- (i) cáncer de mama, en que el método comprende la administración a un sujeto en necesidad del mismo de una cantidad efectiva de dicho al menos un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1; o
- (ii) un sujeto que sufre de carcinoma en necesidad de dicho tratamiento, en que el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de dicho al menos un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

5. Un compuesto seleccionado de los siguientes:



10

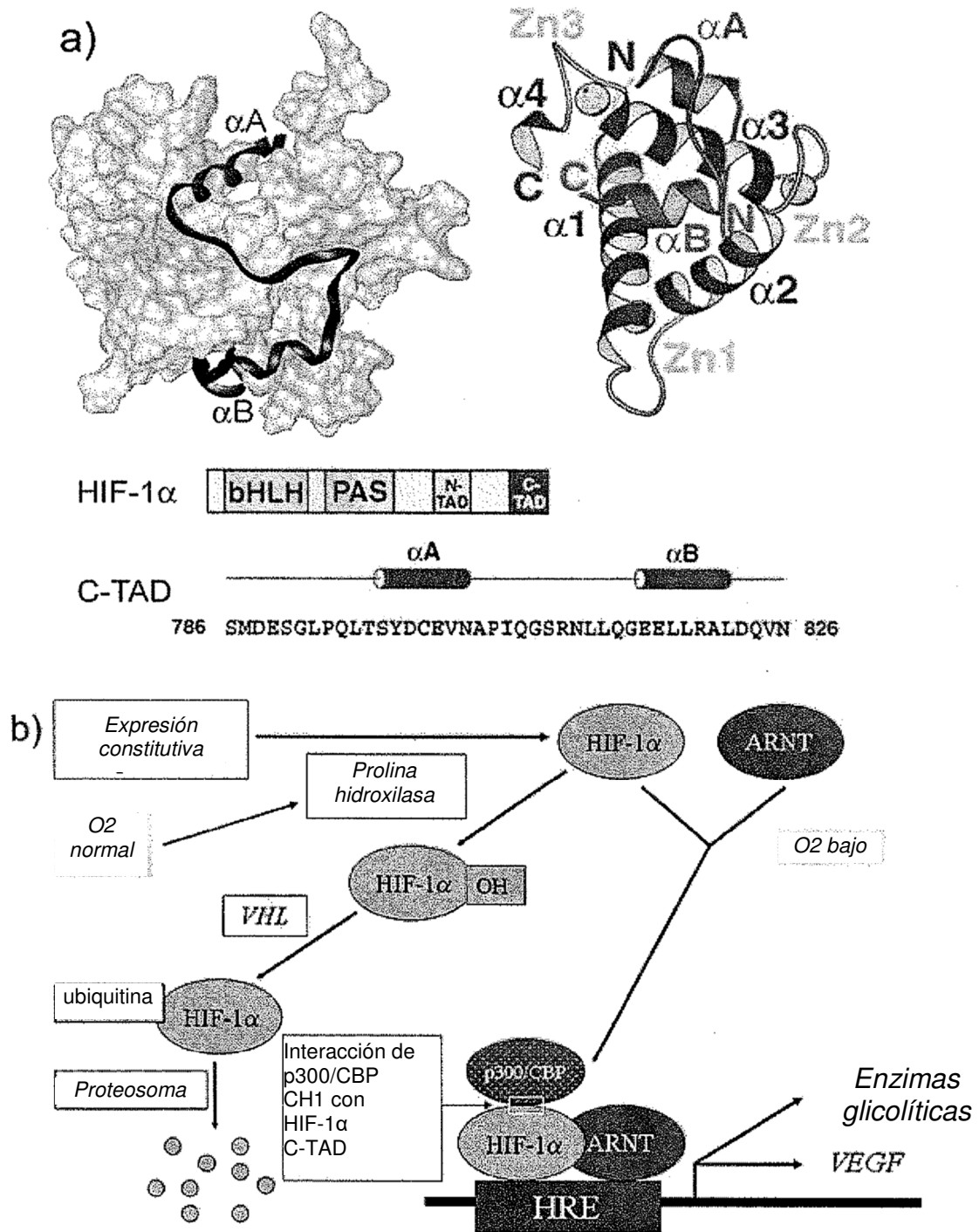
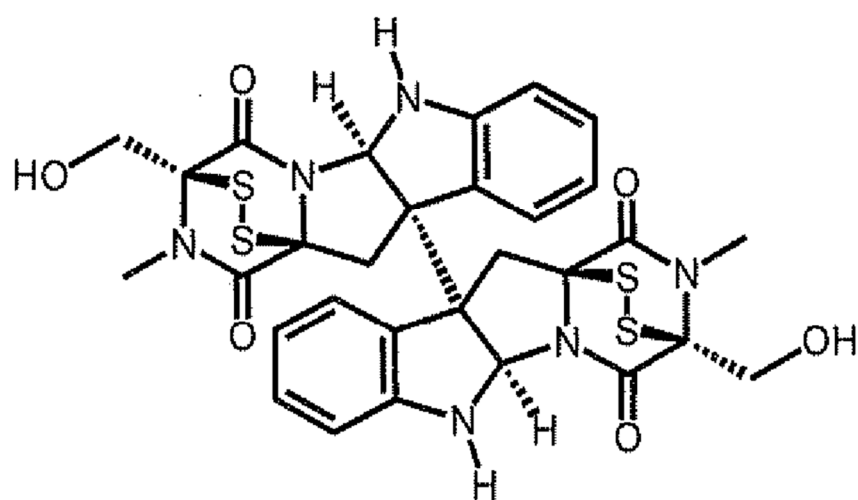
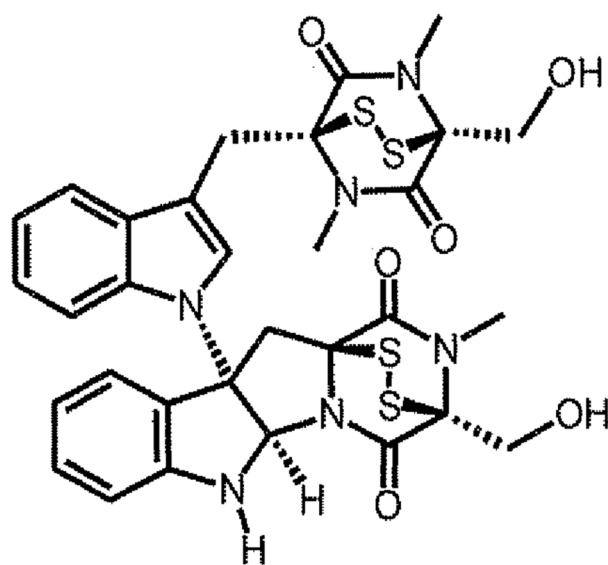


Figura 1



Quetocina



Quetomina

Figura 2

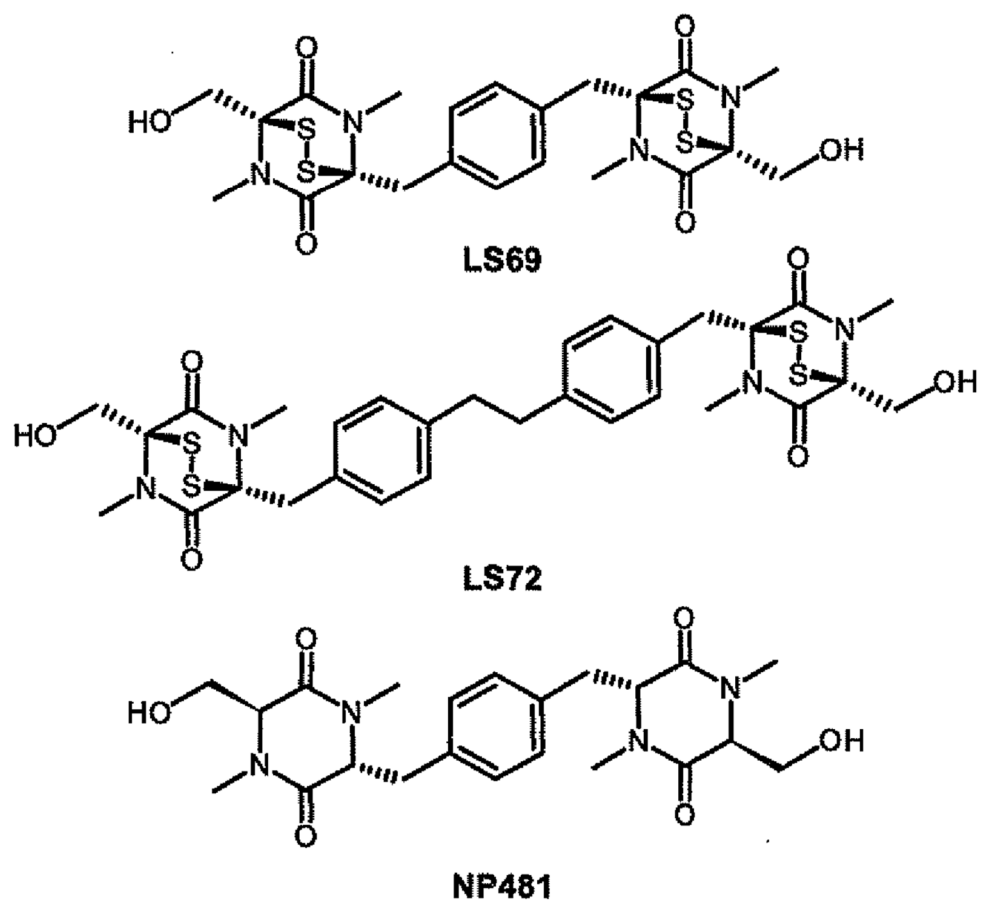
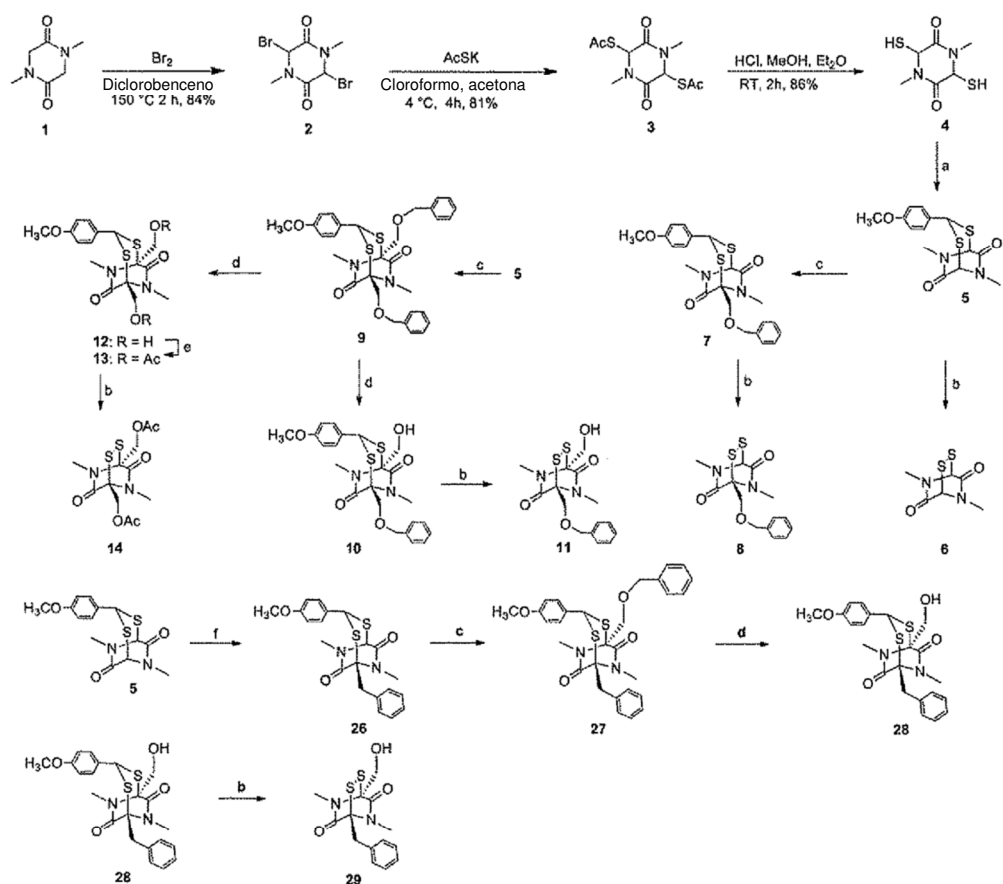


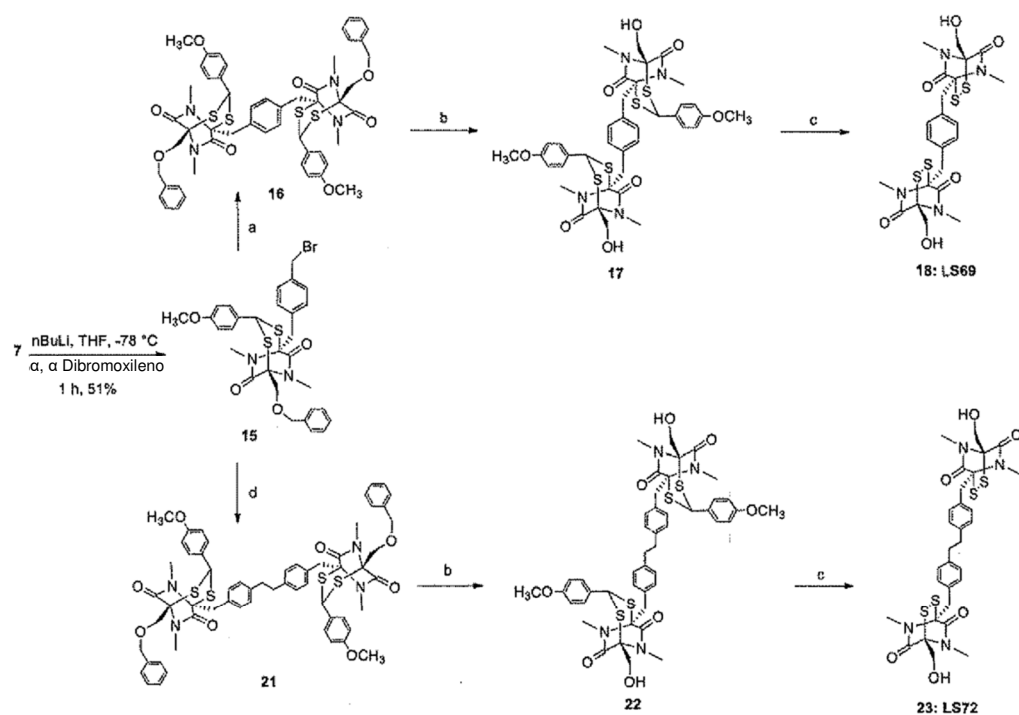
Figura 3



Síntesis de tioacetales y ETP de anillo único

a: p-Anisaldehído, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, DCM, RT, 16h, 92% **b:** mCPBA, ME_2S , HClO_4 , **c:** BOMCl, nBuLi, THF, -78°C , **d:** BCl_2 , CH_2Cl_2 , **e:** AcCl, piridina, CH_2Cl_2 , **f:** nBuLi, THF, -78°C , BnCl.

Figura 4



Síntesis de ETP puenteadas

a: 7, $n\text{BuLi}$, THF, -78°C , **b:** BCl_3 , CH_2Cl_2 , **c:** $m\text{CPBA}$, Me_2S , HClO_4 , **d:** $n\text{BuLi}$, THF, -78°C

Figura 5

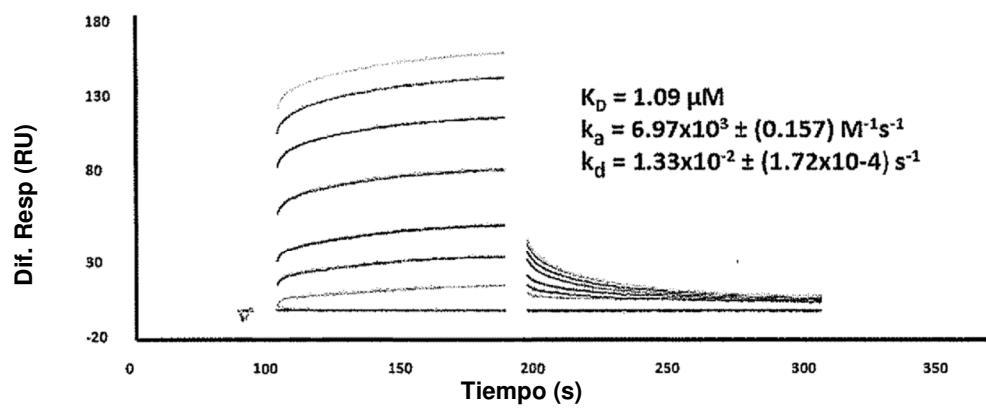


Figura 6

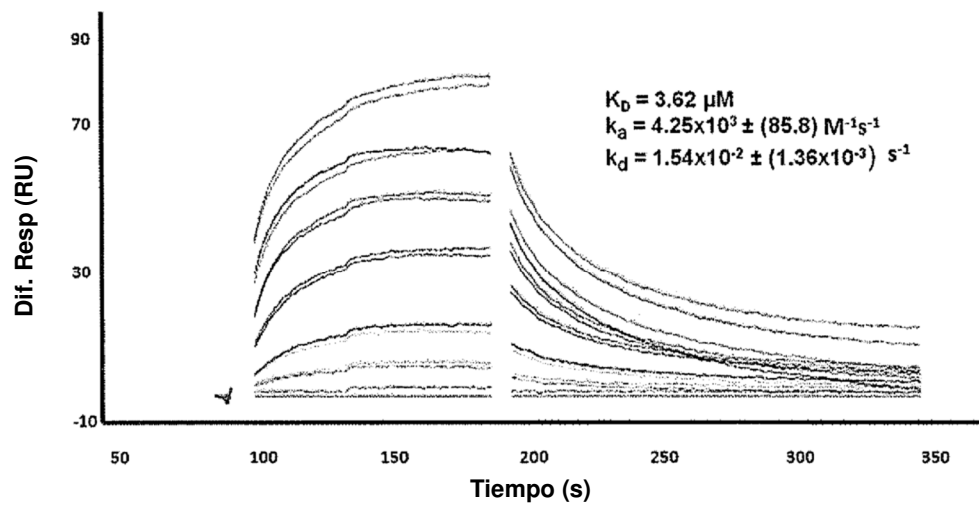


Figura 7

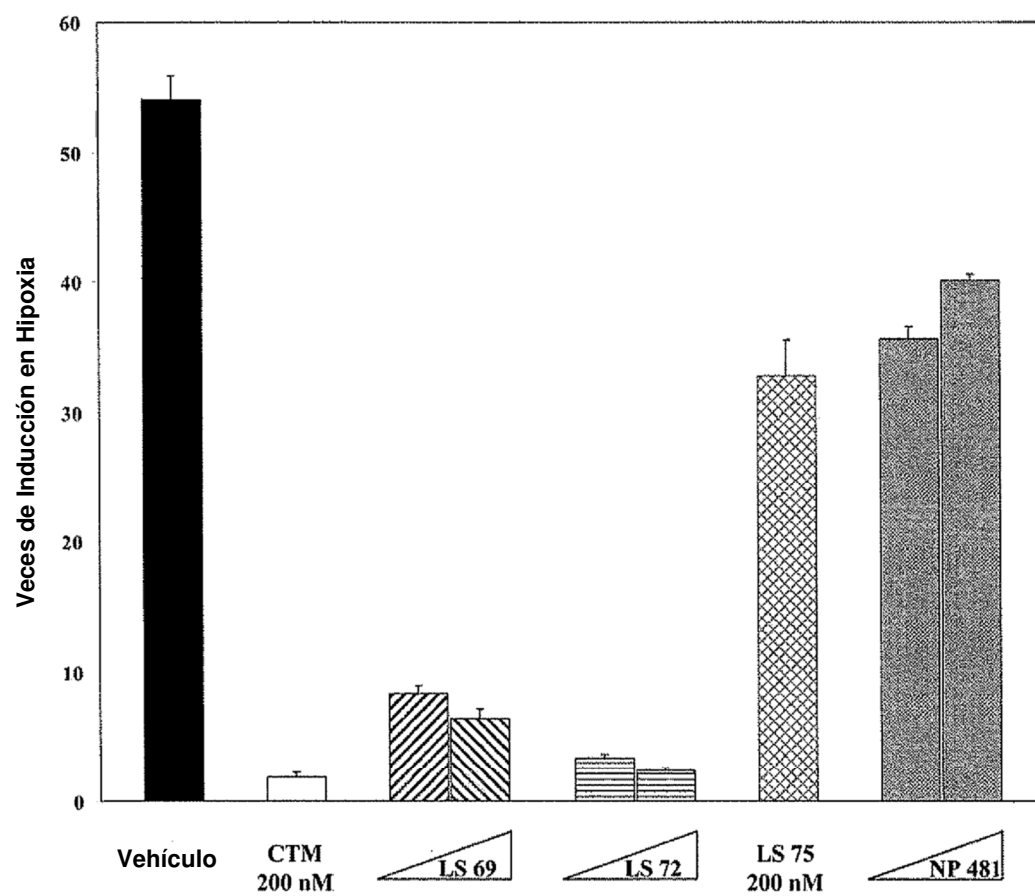


Figura 8

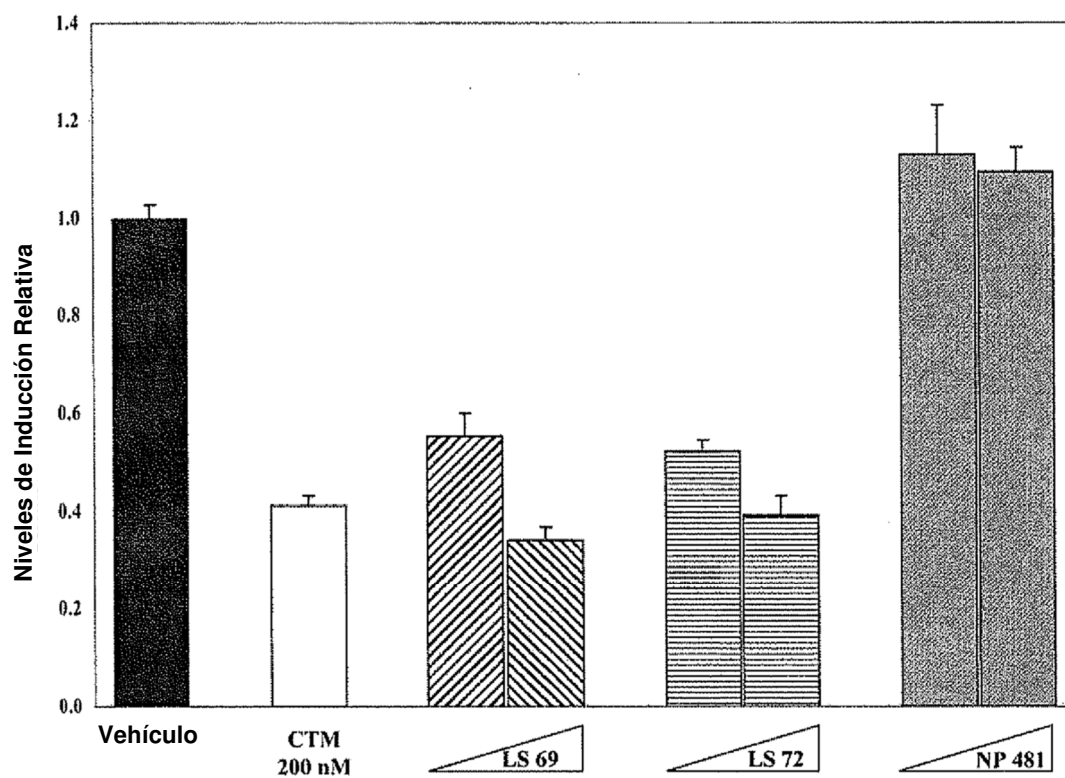


Figura 9

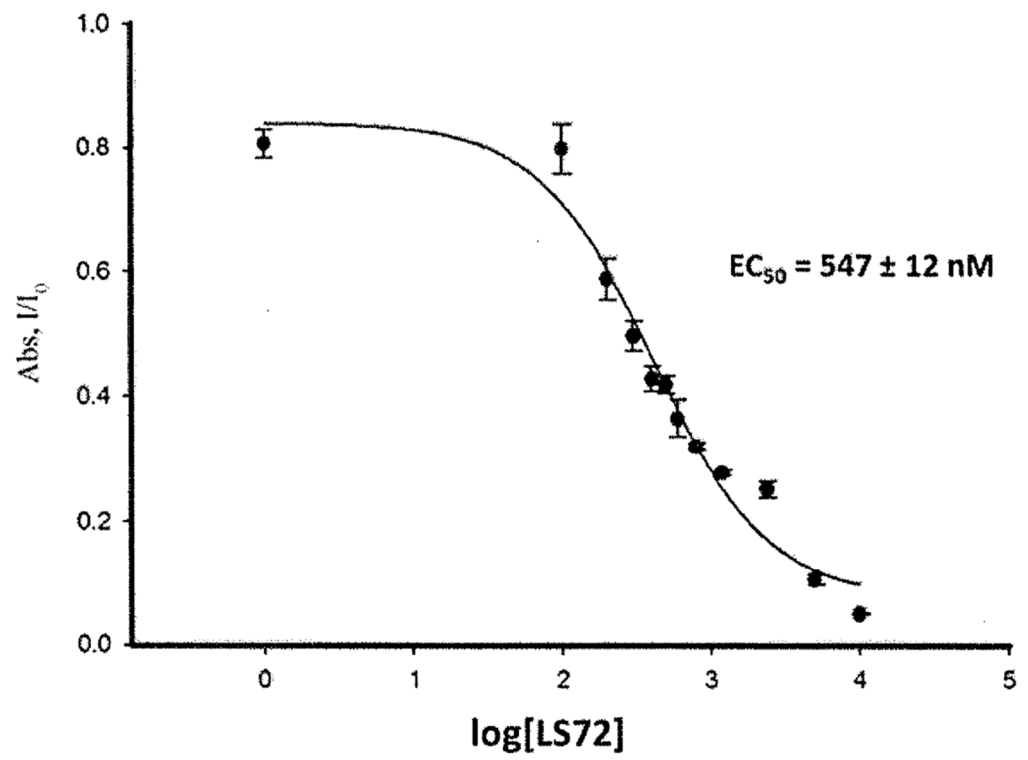


Figura 10

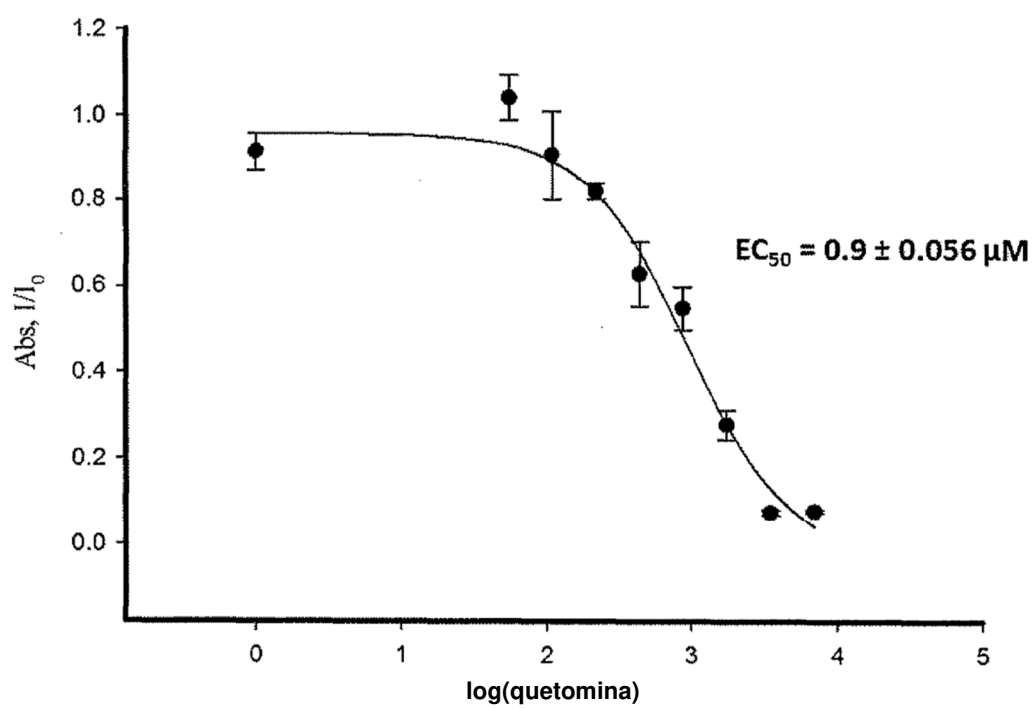


Figura 11

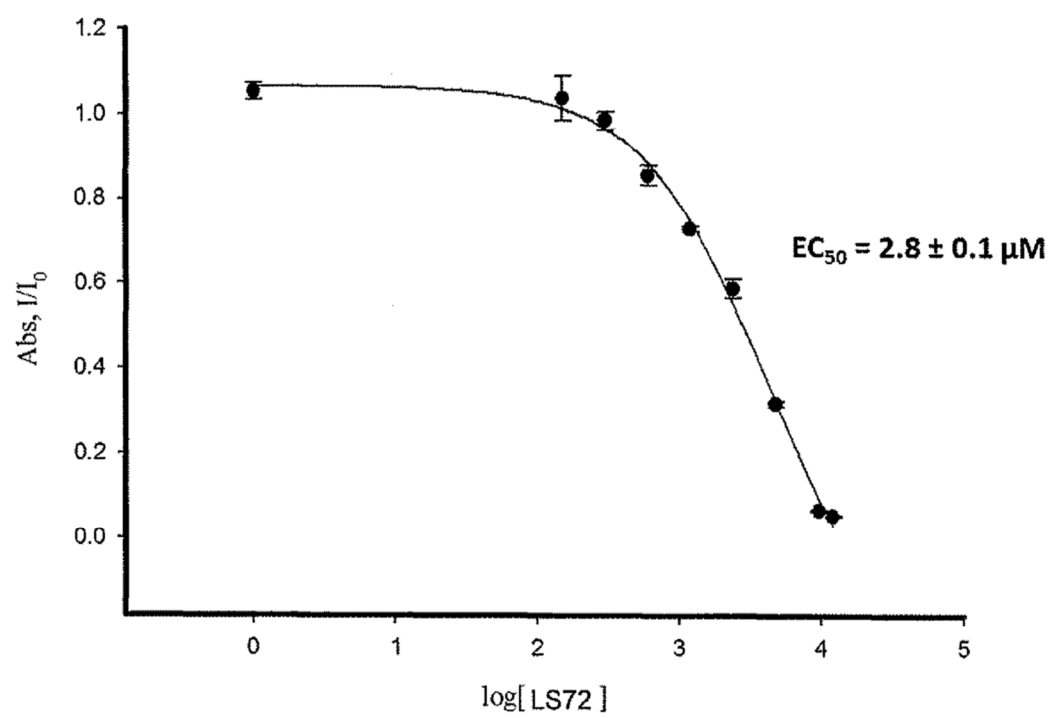


Figura 12

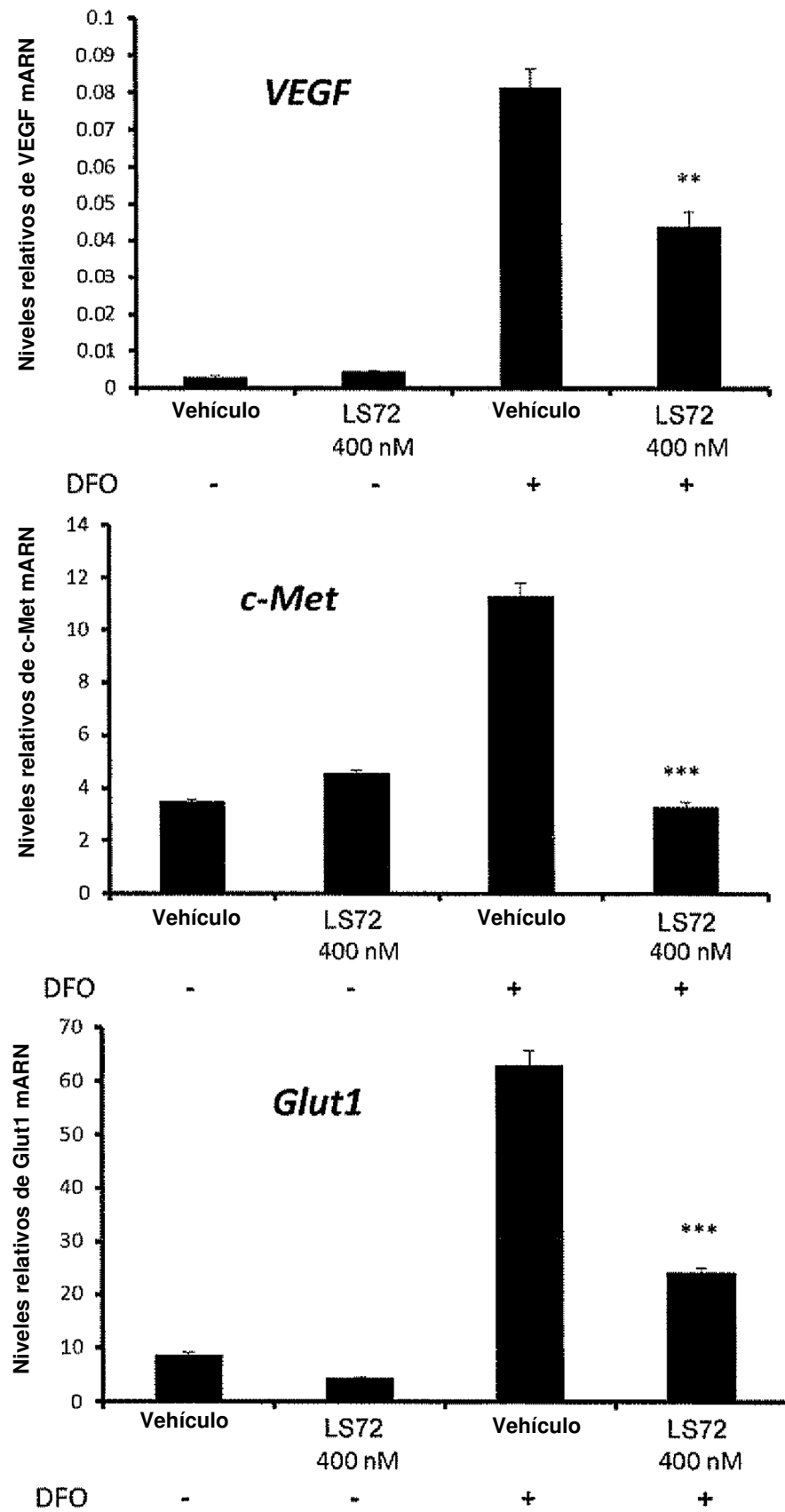


Figura 13

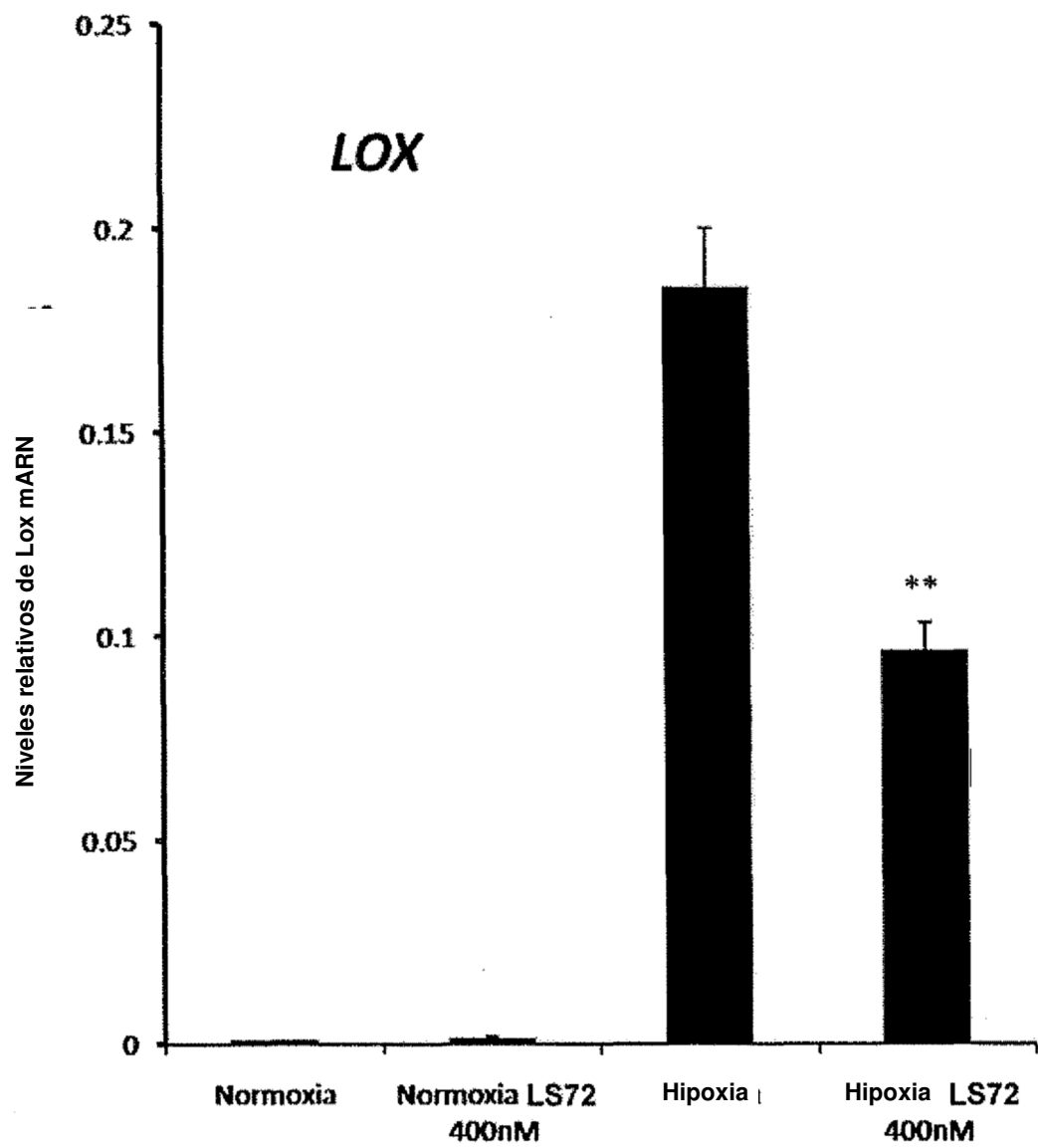


Figura 14A

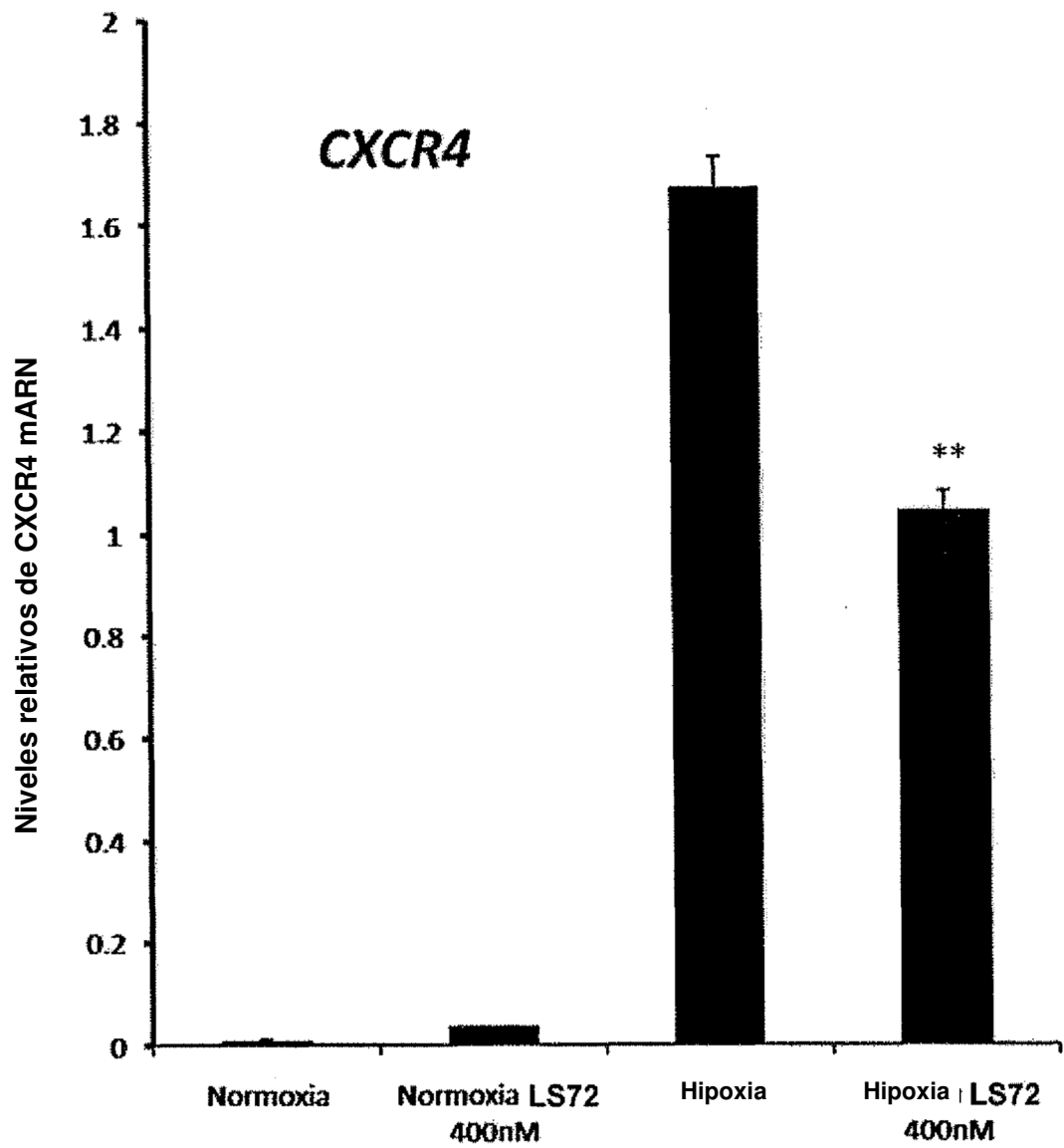


Figura 14B

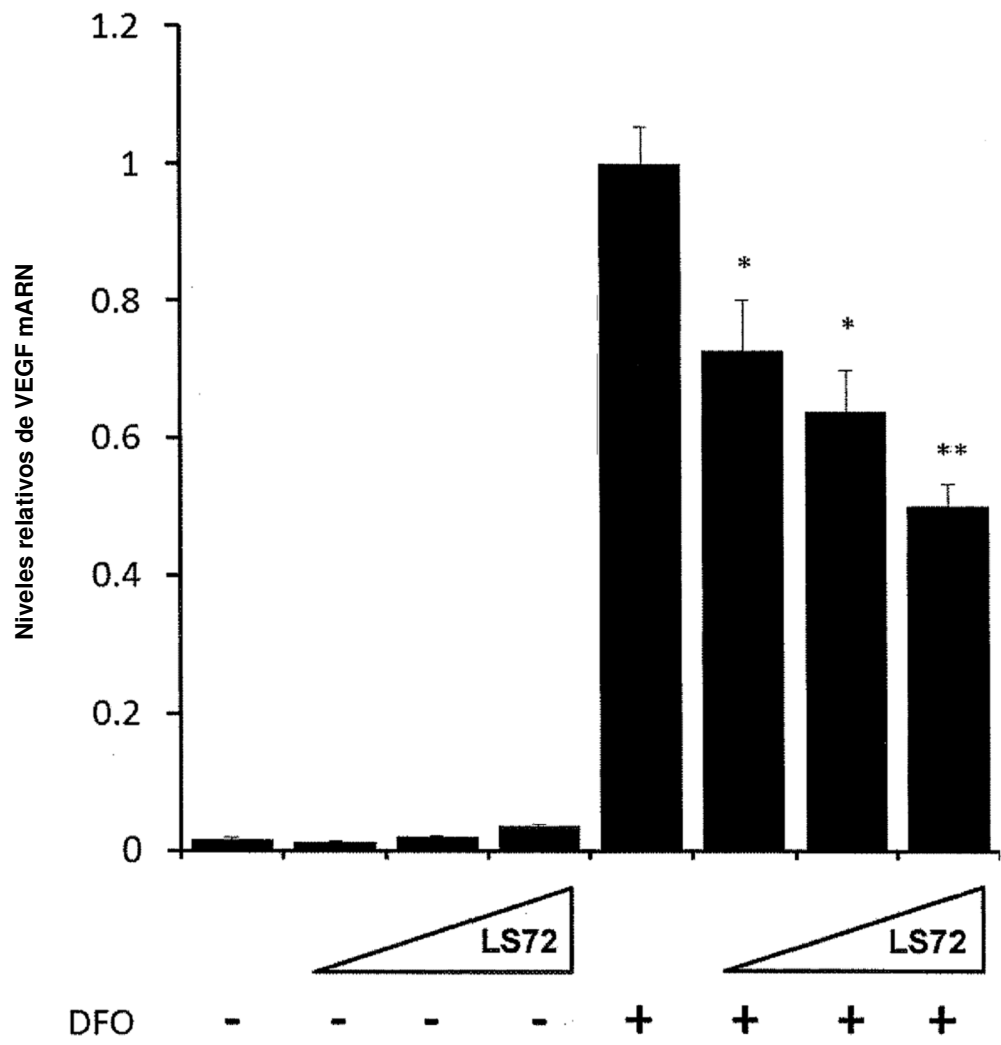


Figura 15

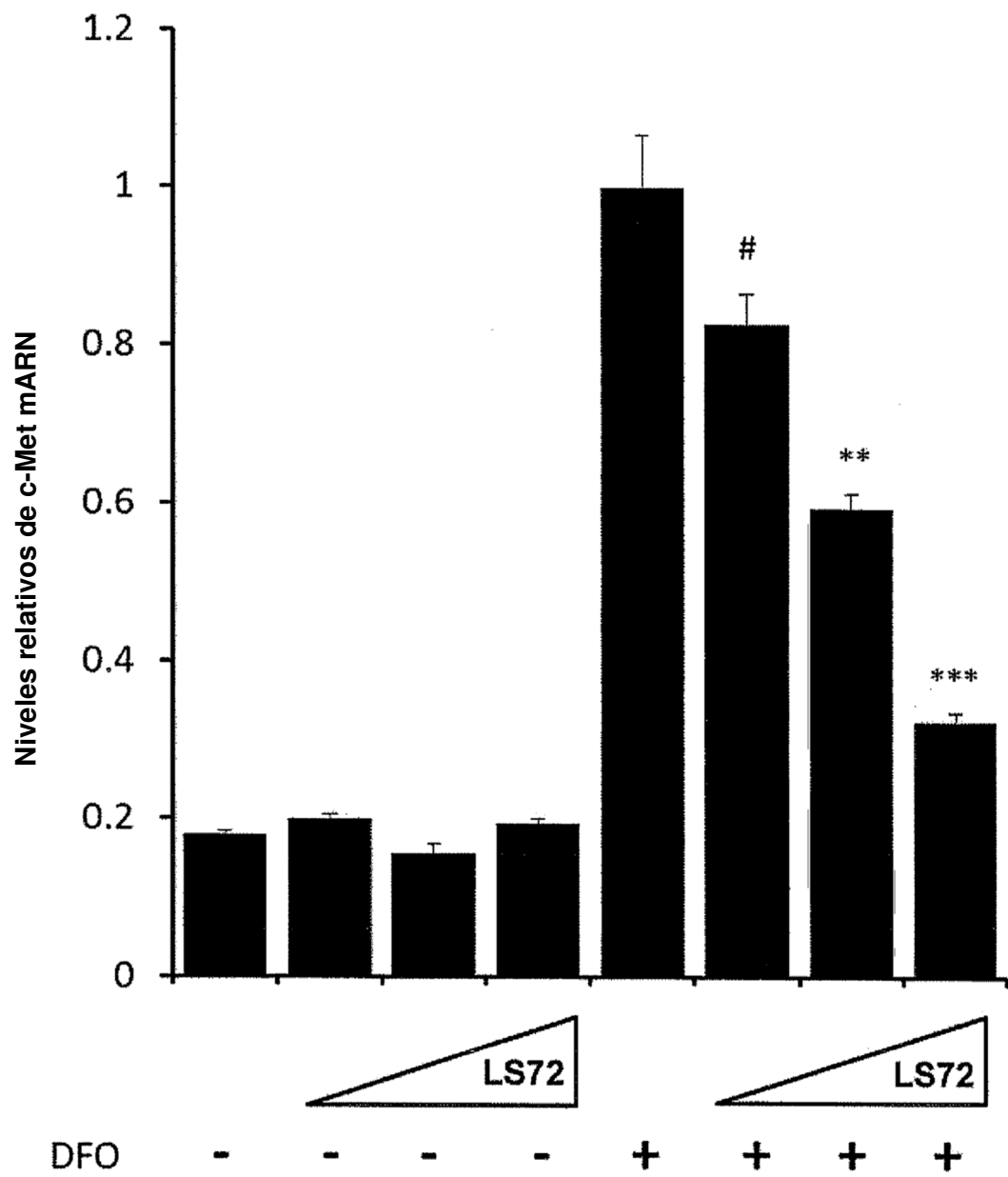


Figura 16

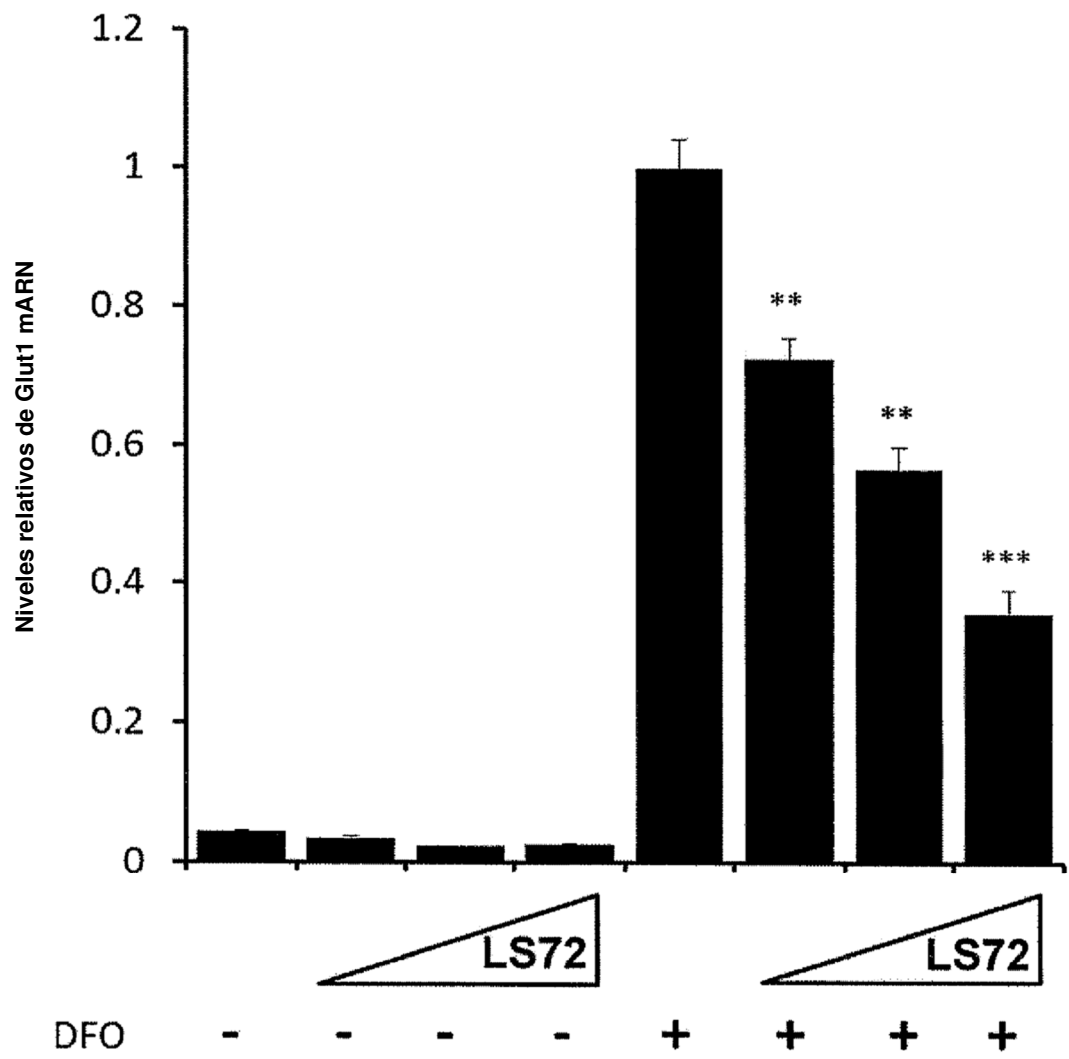


Figura 17

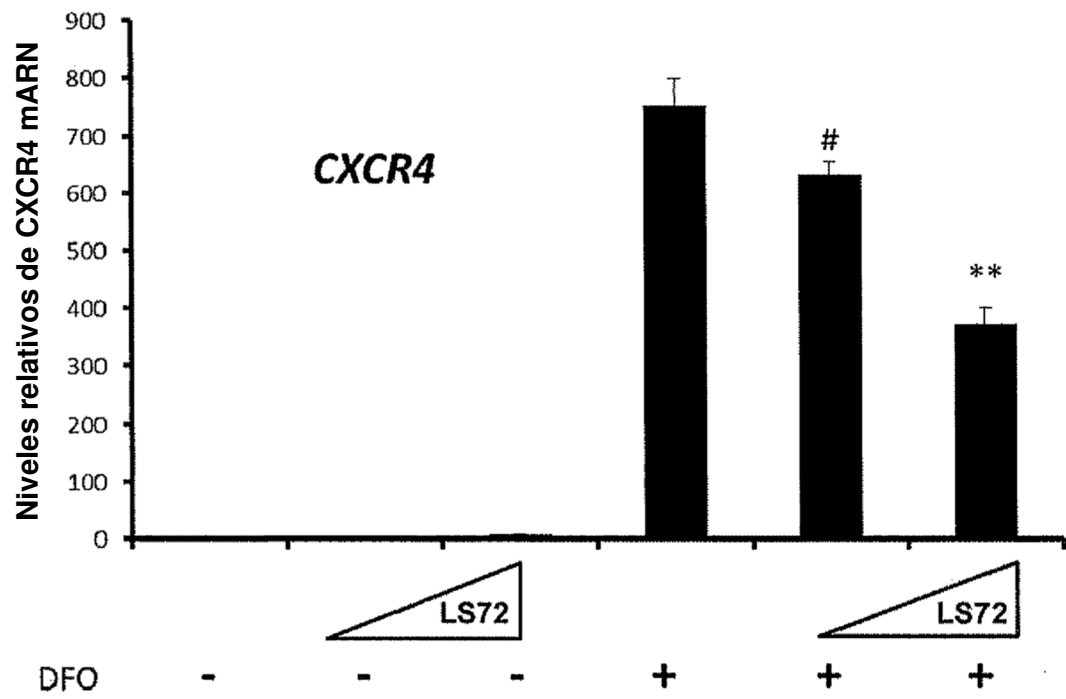
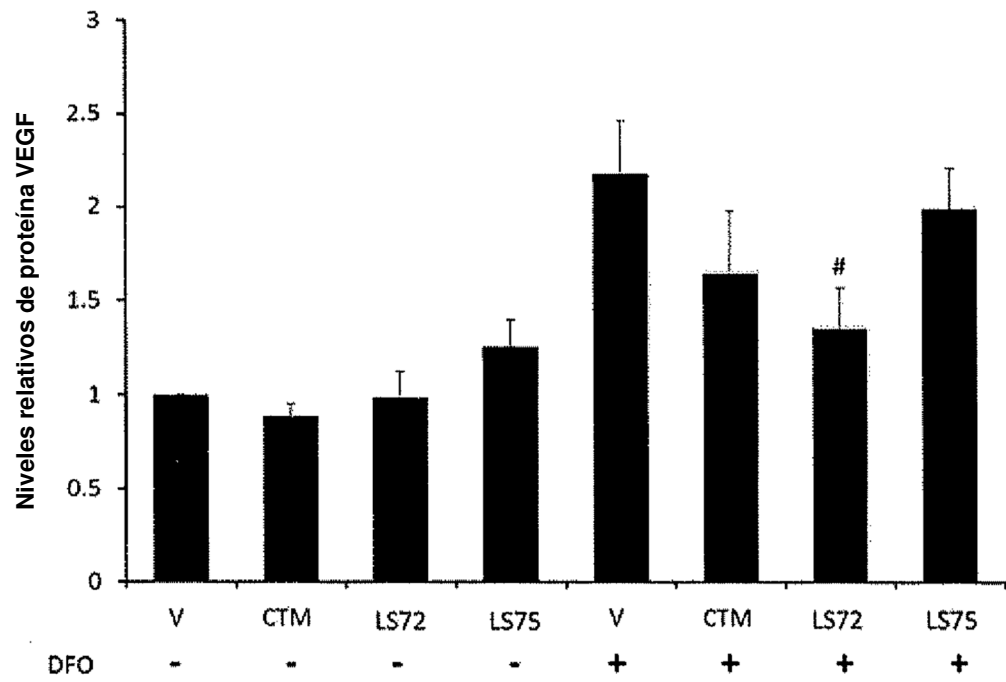


Figura 18

a)



b)

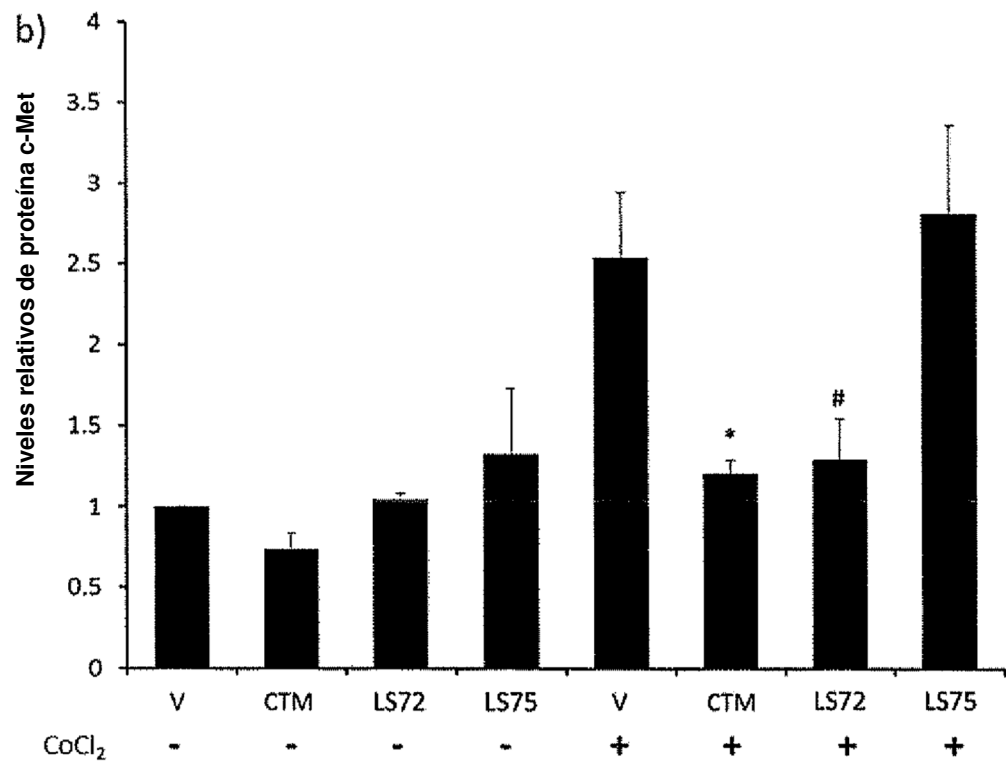


Figura 19

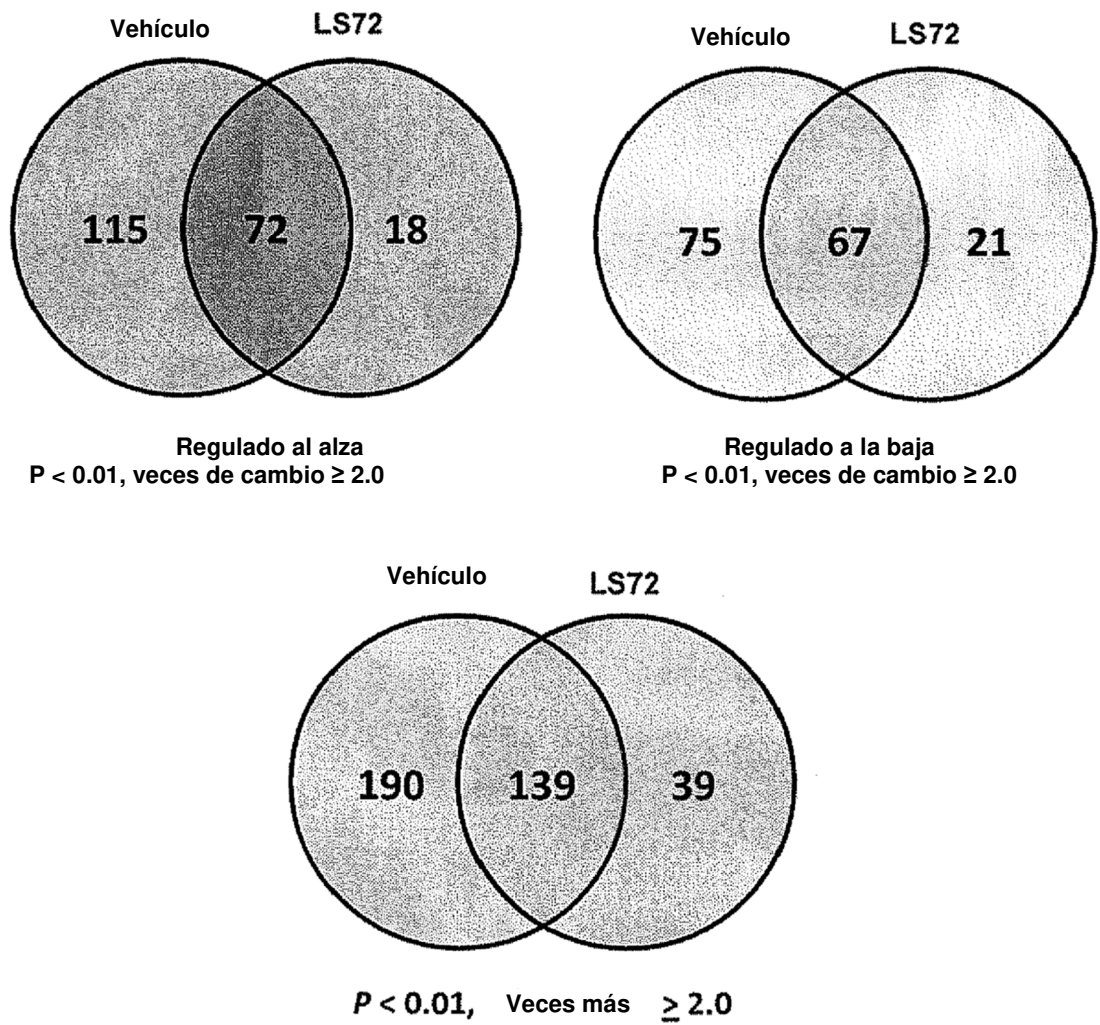


Figura 20

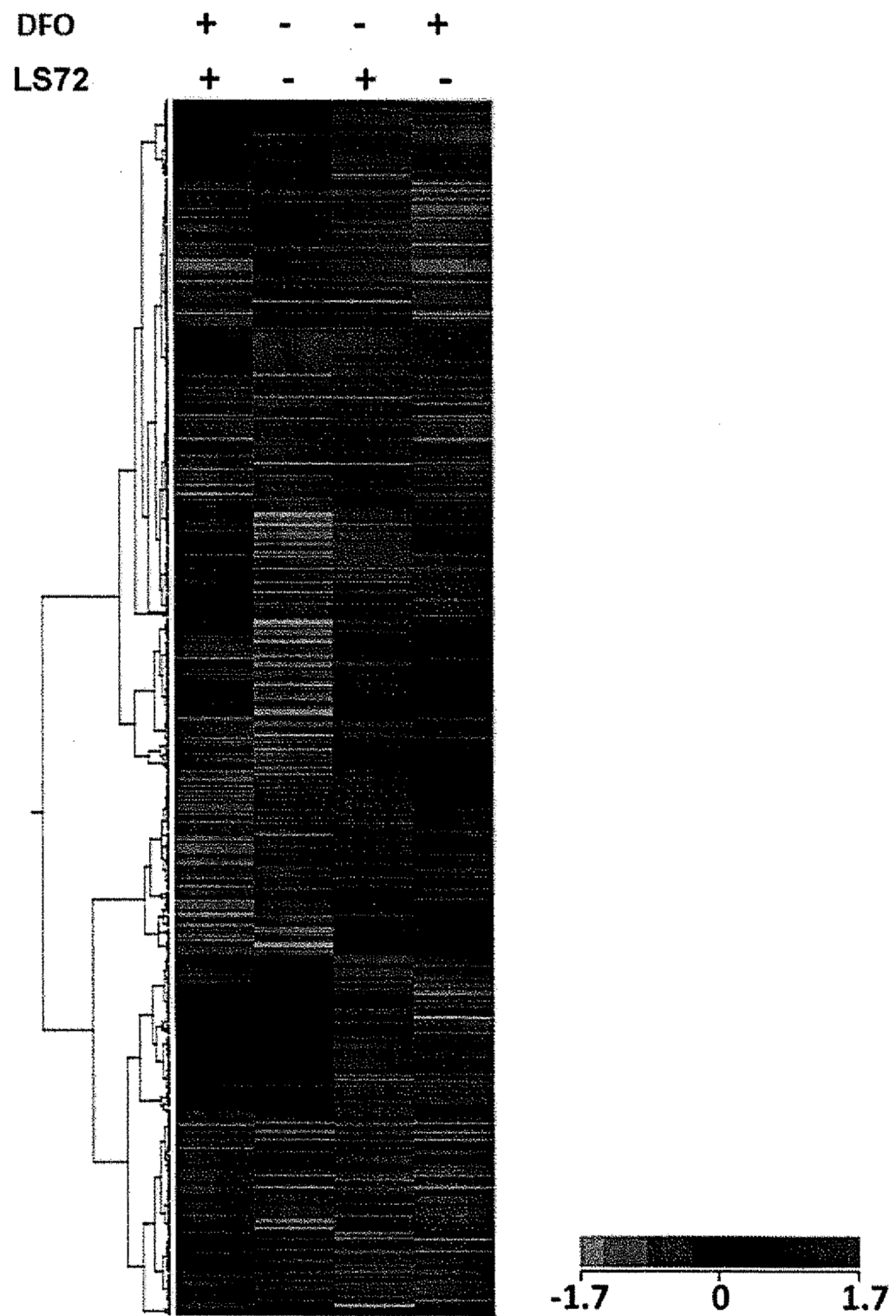


Figura 21

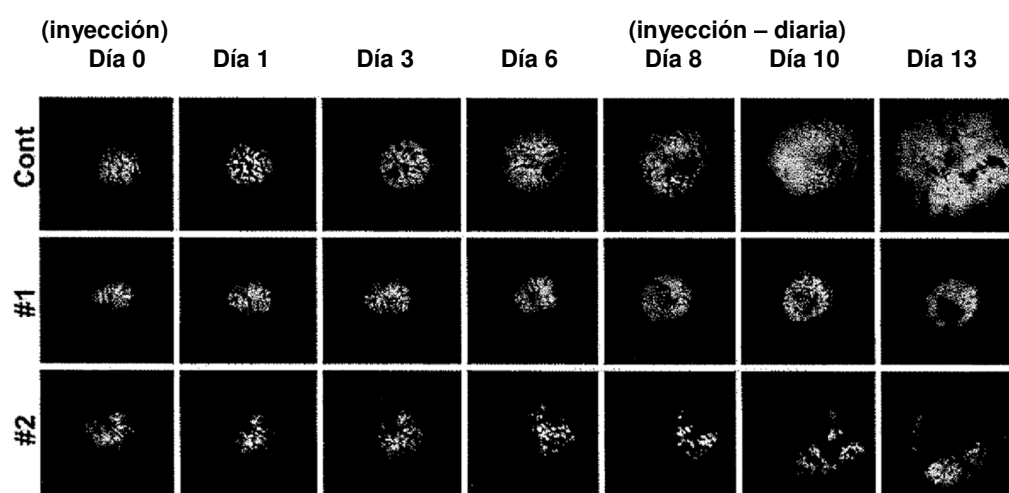


Figura 22

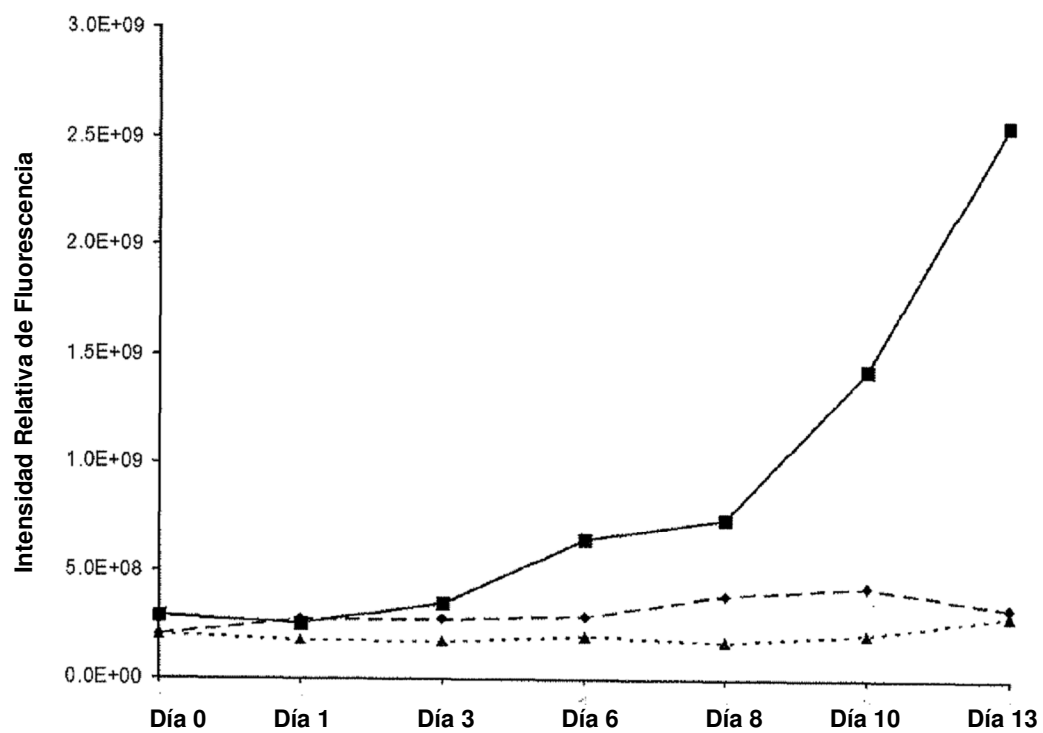


Figura 23

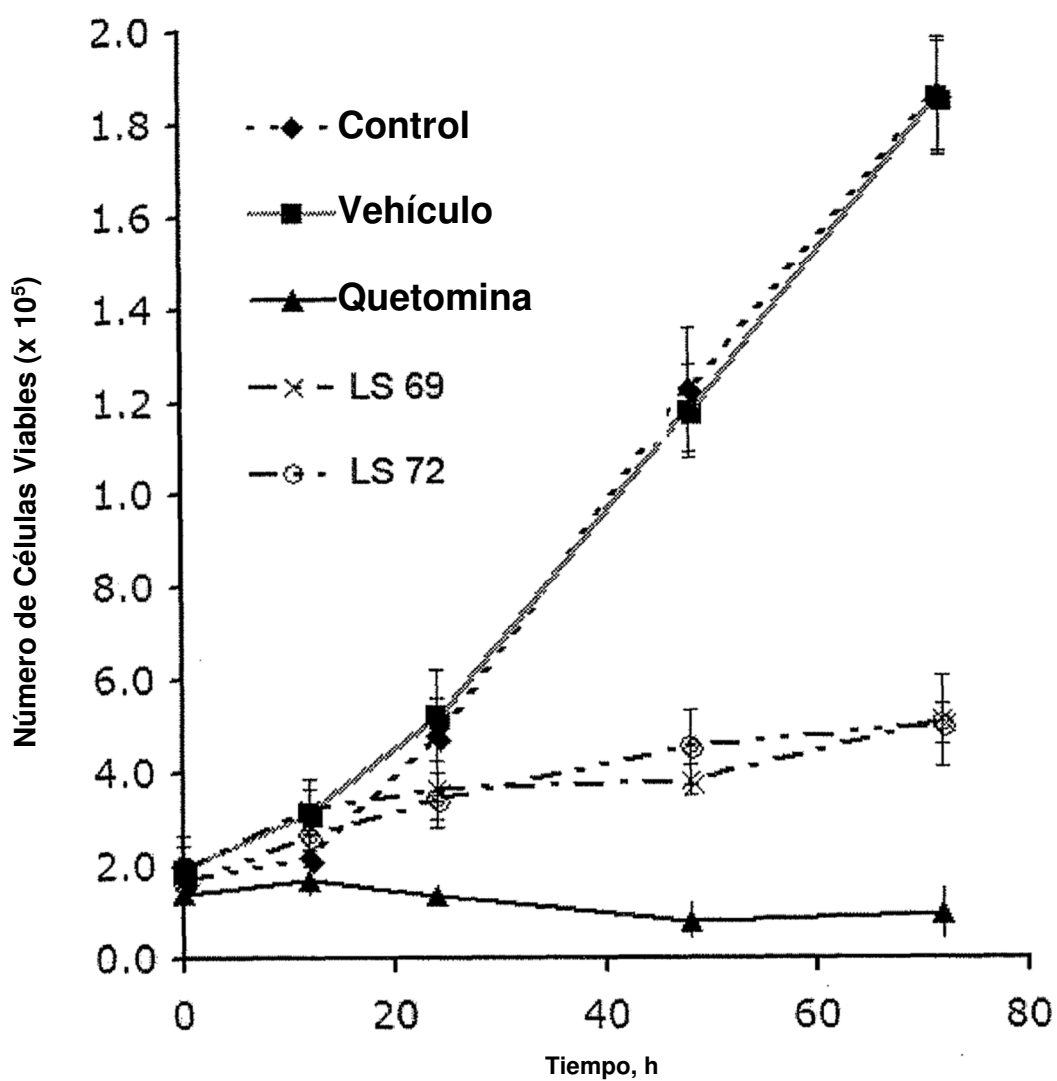


Figura 24