

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 893**

51 Int. Cl.:

C07C 321/20 (2006.01)

C07C 323/07 (2006.01)

C07C 323/16 (2006.01)

C07C 323/20 (2006.01)

C07D 213/52 (2006.01)

C07D 333/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2005 PCT/US2005/013474**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2005 WO05112933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2005 E 05779301 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 1742635**

54 Título: **Compuestos organosulfurados y métodos de utilización de los mismos**

30 Prioridad:

20.04.2004 US 564151 P

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

17.04.2018

73 Titular/es:

**ACEA BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
11585 SORRENTO VALLEY ROAD, SUITE 103
SAN DIEGO CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**XU, XIAO;
AN, HAOYUN y
WANG, XIAOBO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 663 893 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

Compuestos organosulfurados y métodos de utilización de los mismos5 **Campo técnico**

La invención se refiere a compuestos organosulfurados y a métodos de utilización de los mismos.

10 **Técnica anterior**

10 El cáncer sigue siendo uno de los desafíos médicos no resueltos más importantes para la humanidad. Se encuentran disponibles varias opciones para tratar tumores, que incluyen cirugía, radiación, quimioterapia o cualquier combinación de estos enfoques. Entre estos, la quimioterapia se utiliza ampliamente para todos los tipos de cáncer, en particular para aquellos inoperables o con características metastásicas. A pesar de la variedad de
15 compuestos quimioterapéuticos que se utilizan en las clínicas, la quimioterapia generalmente no es curativa, sino que solo retrasa la progresión de la enfermedad. Comúnmente, los tumores y su metástasis se vuelven refractarios a la quimioterapia, ya que las células tumorales desarrollan la capacidad de resistencia a múltiples fármacos. En algunos casos, los tumores son inherentemente resistentes a algunas clases de agentes quimioterapéuticos. En otros casos, la resistencia adquirida contra los agentes quimioterapéuticos se desarrolla durante la intervención
20 quimioterapéutica. Por lo tanto, todavía existen limitaciones significativas a la eficacia de los compuestos quimioterapéuticos disponibles en el tratamiento de diferentes clases de tumores. Además, muchos agentes citotóxicos y citostáticos utilizados para el tratamiento quimioterapéutico de tumores tienen efectos secundarios graves, que dan como resultado la interrupción de la quimioterapia en algunos pacientes. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de nuevos agentes quimioterapéuticos.

25 El trisulfuro de dibencilo (DBTS) es un metabolito secundario de polisulfuro biológicamente activo que se aisló del arbusto subtropical *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). Se ha informado de que EL DBTS tiene actividades inmunomoduladoras ("Immunomodulatory activities of *Petiveria alliacea*", de Williams, L. A. D., Gardner, T. L., Fletcher, C. K., Naravane, A., Gibbs, N. y Fleischhacker, R. *Phytother. Res.*, 1997, 11, 251-253; "A sulfonic anhydride derivative from dibenzyl trisulphide with agro-chemical activities", de Williams, L. A. D., Vasquez, E., Klaiber, I., Kraus, W. y Rosner, H. *Chemosphere*, 2003, 51, 701-706). Al investigar los mecanismos celulares y moleculares del DBTS para determinar su actividad inmunomoduladora, Rosner y colaboradores informaron de que el DBTS se une preferentemente a una región aromática de albúmina de suero bovino y atenúa la desfosforilación de los residuos de tirosilo de la MAP quinasa (erk1/erk2) en células de neuroblastoma SH-SY5Y (en "Disassembly of microtubules and inhibition of neurite outgrowth, neuroblastoma cell proliferation, and MAP kinase tyrosine
35 dephosphorylation by dibenzyl trisulphide", de Rosner, H., Williams, LAD, Jung, A. y Kraus, W. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1540, 166-177). Además, informaron de que el DBTS provoca un desensamblaje reversible de los microtúbulos y no afectaba a la dinámica de la actina en las células de neuroblastoma SH-SY5Y y en los fibroblastos de pulmón humano Wistar 38. Además, informaron de que el DBTS también inhibe la proliferación de células de neuroblastoma y el crecimiento de neuritas a partir de explantes de médula espinal.

40 En un estudio diferente, Mata-Greenwood y colaboradores sometieron a ensayo la actividad antiproliferativa y diferenciadora de un gran conjunto de extractos derivados de varias plantas ("Discovery of novel inducers of cellular differentiation using HL-60 promyelocytic cells", de Mata-Greenwood, E., Ito A., Westernburg, H., Cui, B., Mehta, R. G., Kinghorn, A. D. y Pezzuto, J. M. *Anticancer Res.* 2001, 21, 1763-1770). Estos informaron de que el extracto lipofílico de las raíces de *Petiveria alliacea* L., y la fracción activa del extracto lipófilo mostraron actividad antiproliferativa y diferenciadora en células promielocíticas HL-60. A partir de la fracción activa del extracto lipófilo, aislaron dos compuestos organosulfurados activos, es decir, 2-[(fenilmetil)ditio]etanol y trisulfuro de dibencilo. Informaron de que estos dos compuestos organosulfurados inducían una diferenciación similar a los monocitos y una fuerte citotoxicidad. Además, informaron de que ninguno de estos dos productos aislados demostraba actividad antiproliferativa en células HL-60.

50 El documento US 5 464 861 A describe 2-tioindoles y compuestos análogos de 2-indolintona y polisulfuro para su uso en el tratamiento de ciertos cánceres en un mamífero.

55 Rösner et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1540, 166-177 ("Disassembly of microtubules and inhibition of neurite outgrowth, neuroblastoma cell proliferation, and MAP kinase tyrosine dephosphorylation by dibenzyl trisulphide") describen un trisulfuro dibencilo que inhibe la proliferación de células del neuroblastoma y el crecimiento de neuritas a partir de explantes de la médula espinal.

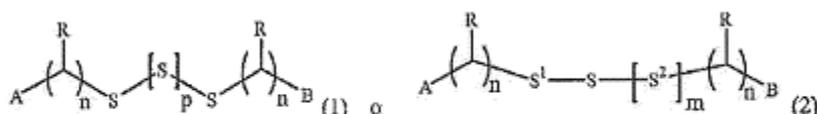
60 Adicionalmente, Ryu et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2004, 12(5), 859-864 ("Synthesis of radioiodine labeled dibenzyl disulfide for evaluation of tumor cell uptake") describen experimentos que muestran los efectos inhibidores de disulfuro de bencil-4-halobencilo y alilbencilo sobre células cancerosas.

Mata-Greenwood et al., Anticancer Research, 2001, 21 (3B), 1763-1770 ("Discovery of novel inducers of cellular differentiation using HL-60 promyelotic cells") describen experimentos que muestran que con ciertos compuestos aislados de plantas se podría inducir la diferenciación de células HL-60.

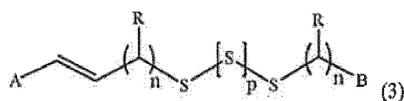
5 **Descripción de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos organosulfurados, composiciones farmacéuticas y a métodos de utilización de los mismos como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas. Más particularmente, la presente invención se refiere a compuestos de di-, tri-, tetra- y penta-sulfuro sustituidos, que incluyen sales farmacéuticamente aceptables y derivados sulfona parcialmente oxidados de los mismos. Los compuestos descritos en la presente memoria muestran actividad antitumoral, anticancerosa, antiinflamatoria, antiinfecciosa y/o antiproliferativa. La presente invención también se refiere a métodos para preparar y formular compuestos organosulfurados.

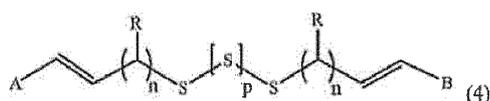
15 La presente descripción proporciona compuestos que tienen la fórmula



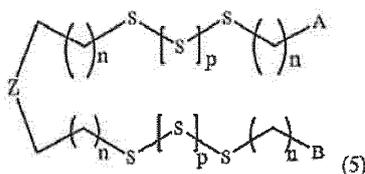
en donde A y B son iguales o diferentes, y son independientemente un arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo, o un anillo de 5-14 miembros que puede ser monocíclico o multicíclico y que contiene opcionalmente un heteroátomo; cada S está opcionalmente en forma de un óxido; S¹ y S² son independientemente S, SO o SO₂; cada R es H, halógeno, carboxilo, ciano, amino, amido, un aminoácido, un sustituyente inorgánico, SR¹, OR¹ o R¹, en donde cada R¹ es alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, un anillo carbocíclico o un anillo heterocíclico, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido y puede contener un heteroátomo; m, n y p son independientemente 0-3; o un compuesto que tiene la fórmula (3) o (4):



o

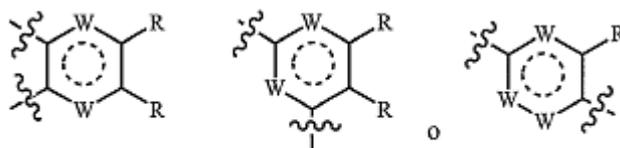


en donde A, B, R, S, n y p se definen como antes; o un compuesto que tiene la fórmula (5):



en donde A, B, S, n y p se definen como antes; y Z es (CR¹)_q o (CR¹=CR¹)_q* en donde q es 0-3 y * representa que C=C se puede reemplazar por alquínulo, O, S, NR; o Z es un anillo de arilo, heteroarilo o heterocíclico opcionalmente sustituido; en donde A y B juntos pueden formar un sistema anular cíclico; y una sal, éster, profármaco o metabolito farmacéuticamente aceptable de los mismos; siempre que dicho compuesto no sea trisulfuro de dibencilo, trisulfuro de di(p-clorobencilo), benciltrisulfuro de (p-clorobencilo), trisulfuro de di(p-nitrobencilo), trisulfuro de di(3-fenil-2-propenilo), trisulfuro de difenilo o trisulfuro de di(p-t-butifenilo).

En las fórmulas 1-5 anteriores, cada Z puede ser

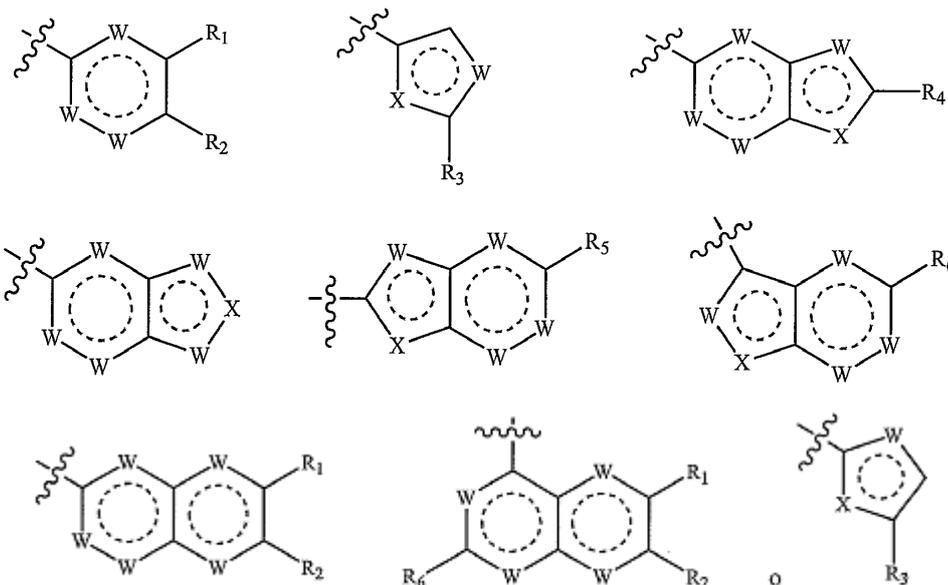


en donde cada W es independientemente un enlace, CR, N, NR, S u O;
cada R se define como antes.

- 5 En las fórmulas 1-5 anteriores, cada R puede ser H, halo, OR^1 , SR^1 , CO_2R^1 , $CONR^1_2$, C=O, CN, CF_3 , OCF_3 , NO_2 , NR_1R_1 , $OCOR_1$; o R es alquilo C_{1-10} , alquilo cíclico C_3-C_{10} , alqueno C_2-C_{10} , alquino C_2-C_{10} , un arilo, heteroarilo, un anillo carbocíclico o un anillo heterocíclico, cada uno de los cuales puede contener un heteroátomo.

- 10 En las fórmulas 1-5 anteriores, cada uno de A y B puede ser benceno, piridina, piridazina, pirimidina, pirazina, triazina, isoxazol, isotiazol, oxadiazol, [1,2,4]oxadiazol, triazol, tiadiazol, pirazol, imidazol, tiazol, oxazol, benzoxazol, pirrol, furano, tiofeno, indolizina, indol, isoindol, indolina, benzofurano, benzotiofeno, indazol, bencimidazol, benzotiazol, purina, quinoxalina, quinolina, isoquinolina, cinolina, ftalazina, quinazolina, quinoxalina, naftiridina, pteridina, acridina, fenazina, fenotiazina, indeno, naftaleno, benzoxadiazol o benzo[1,2,5]oxadiazol.

- 15 En otro aspecto, cada uno de A y B es independientemente



20

en donde X y W son independientemente S, O, NR_7 , CR_7 ;

o una W en un anillo monocíclico o bicíclico de 6 miembros puede ser un enlace; y

- 25 cada R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 es H, halógeno, carboxilo, ciano, amino, aminoácido, amido, un sustituyente inorgánico, SR^1 , OR^1 o R^1 , en donde cada R^1 es alquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, un anillo carbocíclico o un anillo heterocíclico, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido y puede contener un heteroátomo. Por ejemplo, cada R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 puede ser H, halo, OR^1 , SR^1 , CO_2R^1 , $CONR^1_2$, C=O, CN, CF_3 , OCF_3 , NO_2 , NR_1R_1 , $OCOR_1$; o cada R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 es alquilo C_{1-10} , alquilo cíclico C_{3-10} , alqueno C_{2-10} , alquino C_{2-10} , un arilo, heteroarilo, un anillo carbocíclico o un anillo heterocíclico, cada uno de los cuales puede contener un heteroátomo.

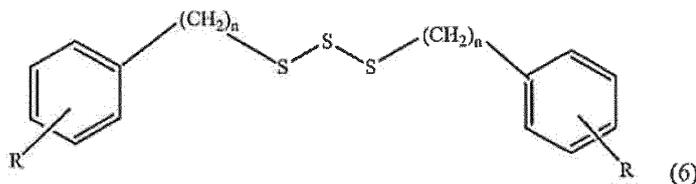
30

Los ejemplos de arilo, heteroarilo o anillo heterocíclico incluyen, pero no se limitan a, piperazina, piperidina, morfolina, tiomorfolina, fenilo, furanilo, tiofenilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, quinoxalinilo, tiazolilo, oxazolilo, imidazolilo, quinolinilo, naftalenilo, piridazinilo, pirazolopirimidinilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo, benceno-tiofeno, pirazolilo, pirrolilo, indolilo, isoindolilo, quinoliznilo, quinolinilo, isoquinolinilo o quinazolínilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con un heteroátomo seleccionado entre O, N, S y halo; o sustituido con alquilo C_{1-10} , alquilo cíclico C_{3-10} , alqueno C_{2-10} , alquino C_{2-10} , arilo o heterociclo, conteniendo cada uno opcionalmente un heteroátomo.

35

- 40 En las fórmulas 1-5 anteriores, cada S puede ser un mono-óxido o un di-óxido.

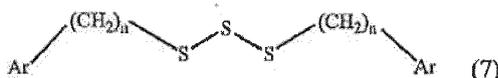
La presente invención se refiere a un compuesto, teniendo el compuesto la fórmula (6)



y cada n es 1-3; y

5 R es H, halo, alquilo o alquilo halogenado.

En otro aspecto, el compuesto tiene la fórmula (7)



10

en donde Ar es un tiofeno, benzotiofeno, piridina o pirazina opcionalmente sustituidos.

Los ejemplos de compuestos que tienen la fórmula 1-5 incluyen, pero no se limitan a, trisulfuro de di(fluorobencilo), trisulfuro de di(o-clorobencilo), trisulfuro de di(metilbencilo), trisulfuro de di(trifluorometilbencilo), trisulfuro de di(2-feniletilo), trisulfuro de di(2-tiofen-il-metilo), trisulfuro de di(4-piridin-il-etilo), trisulfuro de di(2-pirimidin-il-etilo) o trisulfuro de di(3-benzotiofen-il-metilo). En ejemplos concretos, el compuesto es trisulfuro de di(p-fluorobencilo), trisulfuro de di(m-metilbencilo) o trisulfuro de di(p-metilbencilo).

15

En otra realización, la presente invención proporciona métodos para preparar una composición que comprende un compuesto que tiene una fórmula como se describió anteriormente, y también proporciona composiciones preparadas de acuerdo con tales métodos. En un aspecto, la presente invención proporciona un método que comprende: a) disolver un compuesto de la reivindicación 1 en un disolvente orgánico soluble en agua, un disolvente no iónico, un lípido soluble en agua, una ciclodextrina, una vitamina, un ácido graso, un éster de ácido graso, un fosfolípido, o una combinación de los mismos, para proporcionar una solución; y b) añadir solución salina o un tampón que contiene solución de carbohidrato al 1-10%. El disolvente orgánico puede ser polietilenglicol (PEG), un alcohol, N-metil-2-pirrolidona, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido o una combinación de los mismos.

25

En el procedimiento anterior, el tensioactivo no iónico puede ser trirricinooleato de polioxietilenglicerol 35, succinato de PEG, polisorbato 20, polisorbato 80, 12-hidroxiestearato de polietilenglicol 660, monooleato de sorbitán, poloxámero, aceite persico etoxilado, macrogol-8-glicérido de caprilo-caproilo, éster de glicerol, glicérido caprílico PEG 6, glicerina, glicol-polisorbato o una combinación de los mismos. Los ejemplos concretos de superficies no iónicas son CREMOPHOR® modificado con polietilenglicol (trirricinooleato de polioxietilenglicerol 35), CREMOPHOR® EL, CREMOPHOR® RH40 hidrogenado, CREMOPHOR® RH60 hidrogenado, SOLUTOL® HS (12-hidroxiestearato de polietilenglicol 660), LABRAFIL® (aceite persico etoxilado), LABRASOL® (macrogol-8-glicérido de caprilo-caproilo), GELUCIRE® (éster de glicerol) y SOFTIGEN® (glicérido caprílico PEG 6).

30

35

En el procedimiento anterior, el lípido puede ser un aceite vegetal, un triglicérido, un aceite vegetal o una combinación de los mismos. Por ejemplo, el lípido puede ser aceite de ricino, aceite de ricino polioxilado, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de menta, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de soja, aceite vegetal hidrogenado, aceite de soja hidrogenado, un triglicérido de aceite de coco, aceite de semilla de palma, y formas hidrogenadas de los mismos, o una combinación de los mismos.

40

En el procedimiento anterior, la vitamina puede ser tocoferol; y el ácido graso y el éster de ácido graso pueden ser ácido oleico, un monoglicérido, diglicérido, un mono- o di-éster de ácido graso de PEG, o una combinación de los mismos.

45

En el procedimiento anterior, la ciclodextrina puede ser alfa-ciclodextrina, beta-ciclodextrina, hidroxipropil-beta-ciclodextrina o sulfobutiléter-beta-ciclodextrina. El fosfolípido puede ser fosfatidilcolina de soja, o diestearoil fosfatidilglicerol, y formas hidrogenadas de los mismos, o una combinación de los mismos. Además, el hidrato de carbono en el procedimiento anterior puede comprender dextrosa.

50

La presente descripción proporciona métodos para preparar un compuesto de fórmula 1-2 como se describió anteriormente, que comprenden: a) poner en contacto N-trimetilsilimidazol con dicloruro de azufre en un disolvente halogenado para proporcionar sulfuro de diimidazolilo; y b) poner en contacto dicho sulfuro de diimidazolilo con mercaptano. En un ejemplo, el disolvente halogenado es diclorometano.

55

En un aspecto, el N-trimetilsilimidazol en hexano se pone en contacto con dicloruro de azufre en diclorometano. En otro aspecto, el dicloruro de azufre como compuesto puro se pone en contacto con N-trimetilsilimidazol en hexano y diclorometano. En otro aspecto más, los métodos comprenden adicionalmente recrystalizar el trisulfuro. En un ejemplo, el trisulfuro se recrystaliza en n-hexanos, hexanos, heptano, éter de petróleo o una combinación de los mismos.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto que tiene la fórmula descrita anteriormente, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales compuestos y composiciones farmacéuticas de los mismos se pueden utilizar para mejorar o tratar el neuroblastoma. Por tanto, la presente invención también proporciona métodos para aliviar o tratar el neuroblastoma, que comprenden administrar a un sistema o sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto que tiene una fórmula como la mencionada anteriormente o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente con un agente antiproliferativo, por medio de los cuales se alivia o se trata dicho neuroblastoma.

La presente descripción también proporciona métodos para aliviar o tratar una afección que comprenden administrar a un sujeto o sistema que lo necesite, cualquier compuesto que tenga una fórmula como la mencionada anteriormente o una composición farmacéutica del mismo, en donde dicho compuesto puede ser trisulfuro de dibencilo, trisulfuro de di(p-clorobencilo), benciltrisulfuro de (p-clorobencilo), trisulfuro de di(p-nitrobencilo), trisulfuro de di(3-fenil-2-propenilo), trisulfuro de difenilo o trisulfuro de di(p-t-butilfenilo). El sujeto puede ser un ser humano o un animal tal como un mamífero. El sistema puede ser una célula o tejido, u otros sistemas a los que se pueden administrar compuestos *in vitro*.

En una realización, la presente descripción proporciona métodos para tratar o aliviar un trastorno proliferativo celular distinto de neuroblastoma, que comprenden la administración a un sistema o sujeto que lo necesite de una cantidad eficaz de cualquier compuesto que tenga una fórmula como se ha mencionado anteriormente o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente con un agente antiproliferativo, por medio del cual dicho trastorno proliferativo celular en dicho sistema o sujeto se alivia o se trata. La presente descripción también proporciona métodos para reducir o inhibir la proliferación celular o para inducir la muerte celular. La presente descripción proporciona adicionalmente métodos para inducir la apoptosis. En ejemplos particulares, el compuesto utilizado en los métodos de la presente descripción son trisulfuro de dibencilo, trisulfuro de di(p-fluorobencilo), trisulfuro de di(p-metilbencilo) o trisulfuro de di(m-metilbencilo), y opcionalmente con un agente antiproliferativo.

En un aspecto, se reduce la proliferación celular, o se induce la muerte de dichas células. El trastorno proliferativo celular puede ser un tumor o cáncer que incluye, entre otros, leucemia, linfoma, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer del SNC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas o cáncer renal. En otro aspecto, se induce la apoptosis celular. En otro aspecto, se interrumpe el ensamblaje o desensamblaje de tubulina, o se inhibe la progresión de G2/M del ciclo celular, la mitosis celular o una combinación de los mismos. En otro aspecto más, se inhiben la proliferación de células endoteliales, la angiogénesis o una combinación de las mismas.

En otra realización, la presente descripción proporciona métodos para aliviar o tratar la reestenosis, que comprenden la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de cualquier compuesto que tenga una fórmula como la mencionada anteriormente o una composición farmacéutica del mismo, por medio de lo cual se alivia o se trata la reestenosis en dicho sujeto. La reestenosis puede estar asociada con hiperplasia de la neointima. Los compuestos se pueden administrar por administración oral o parenteral, o por medio de un dispositivo intraluminal. En otra realización más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular, que comprende cualquier compuesto que tenga una fórmula como la mencionada anteriormente, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-C muestran las respuestas de las células H460 (línea de cáncer de pulmón de células no pequeñas) a diferentes concentraciones de DBTS, colcemida y paclitaxel, respectivamente, como se determina en el Sistema de Detección Electrónica en Tiempo Real (sistema RT-CES).

La Figura 2 muestra las respuestas de las células MV522 (línea celular de cáncer de pulmón) a diferentes concentraciones de trisulfuro de dibencilo (DBTS), como se determina en el sistema RT-CES.

La Figura 3 muestra las respuestas de las células MCF-7 (línea celular de cáncer de mama) a diferentes concentraciones de trisulfuro de dibencilo (DBTS), como se determina en el sistema RT-CES.

La Figura 4 muestra las respuestas de las células A549 (línea celular de cáncer de pulmón) a diferentes concentraciones de trisulfuro de dibencilo (DBTS), como se determina en el sistema RT-CES.

La Figura 5 muestra las respuestas de las células PC3 (línea celular de cáncer de próstata) a diferentes concentraciones de trisulfuro de dibencilo (DBTS) (Figura 6A) y 5-fluorouracilo (Figura 6B), como se determina en el sistema RT-ECS.

La Figura 6 muestra las respuestas de las células A431 (línea celular de cáncer epidermoide) a diferentes

concentraciones de trisulfuro de dibencilo (DBTS), como se determina en el sistema RT-CES.

La Figura 7 muestra las respuestas de las células HT1080 (línea celular de fibrosarcoma) a diferentes concentraciones de trisulfuro de dibencilo (DBTS), como se determina en el sistema RT-CES.

La Figura 8 muestra las respuestas de las células MDA-231 (línea celular de cáncer de mama) a diferentes concentraciones de trisulfuro de dibencilo (DBTS), como se determina en el sistema RT-CES.

La Figura 9 muestra las respuestas de las células HT-29 (línea celular de cáncer de colon) a diferentes concentraciones de trisulfuro de dibencilo (DBTS), como se determina en el sistema RT-CES.

La Figura 10 muestra las respuestas de las células HC-2998 (línea celular de cáncer de colon) a diferentes concentraciones de trisulfuro de dibencilo (DBTS), como se determina en el sistema RT-CES.

La Figura 11 muestra las respuestas de las células OVCAR4 (línea celular de cáncer de ovario) a diferentes concentraciones de trisulfuro de dibencilo (DBTS), como se determina en el sistema RT-CES.

La Figura 12 muestra las respuestas de las células A2780 (línea celular de cáncer de colon) a diferentes concentraciones de trisulfuro de dibencilo (DBTS), como se determina en el sistema RT-CES.

La Figura 13 muestra las respuestas de las células HepG2 (línea celular de hepatoma humano) a diferentes concentraciones de trisulfuro de dibencilo (DBTS), como se determina en el sistema RT-CES.

La Figura 14 muestra tumores S180 de sarcoma de ratón (implantados en ratones mediante implante subcutáneo) tratados con trisulfuro de dibencilo (DBTS).

La Figura 15 muestra cáncer de pulmón de Lewis de ratón (implantado en ratones mediante implante subcutáneo) tratado con trisulfuro de dibencilo (DBTS).

La Figura 16 muestra tumores de mama Bcap-37 humanos que fueron transplantados mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante siembra subcutánea y se trataron con el compuesto ACEA100108.

La Figura 17 muestra el cambio dinámico en el tamaño del tumor en el ensayo de eficacia antitumoral *in vivo* del compuesto ACEA100108 en cáncer de mama humano Bcap-37 que fue transplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.

La Figura 18 muestra el cambio dinámico en el peso corporal de los ratones portadores en el ensayo de eficacia antitumoral *in vivo* del compuesto ACEA100108 (100108) en cáncer de mama humano Bcap-37 que fue transplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.

La Figura 19 muestra tumores de colon humano HCT-8 que fueron transplantados mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante siembra subcutánea y se trataron con el compuesto ACEA100108.

La Figura 20 muestra el cambio dinámico en el tamaño del tumor en el ensayo de eficacia antitumoral *in vivo* del compuesto ACEA100108 en cáncer de colon humano HCT-8 que fue transplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.

La Figura 21 muestra el cambio dinámico en el peso corporal de los ratones portadores en el ensayo de eficacia antitumoral *in vivo* del compuesto ACEA100108 (100108) en cáncer de colon humano HCT-8 que fue transplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.

La Figura 22 muestra tumores ováricos humanos ao10/17 que fueron transplantados mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante siembra subcutánea y se trataron con el compuesto ACEA100108.

La Figura 23 muestra el cambio dinámico en el tamaño del tumor en el ensayo de eficacia antitumoral *in vivo* del compuesto ACEA100108 sobre el cáncer de ovario humano ao10/17 que fue transplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.

La Figura 24 muestra el cambio dinámico en el peso corporal de los ratones portadores en el *in vivo* ensayo de eficacia antitumoral del compuesto ACEA100108 (100108) sobre el cáncer de ovario humano ao10/17 que fue transplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.

La Figura 25 muestra tumores de mama Bcap-37 humanos que fueron transplantados mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo y se trataron con el compuesto ACEA100108.

La Figura 26 muestra las respuestas de varias líneas celulares a ACEA100108, como se determina en el sistema RT-CES.

La Figura 27 muestra las respuestas de la celda HT1080 a diferentes derivados de DBTS, como se determina en el sistema RT-CES.

La Figura 28 muestra las imágenes de microtúbulos en células COS de control que no fueron tratadas con ningún fármaco.

La Figura 29 muestra las imágenes de microtúbulos en células COS tratadas con diferentes concentraciones de paclitaxel durante 4 horas.

La Figura 30 muestra las imágenes de microtúbulos en células COS tratadas con diferentes concentraciones de paclitaxel durante 24 horas.

La Figura 31 muestra las imágenes de microtúbulos en células COS tratadas con diferentes concentraciones de vinblastina durante 4 horas.

La Figura 32 muestra las imágenes de microtúbulos en células COS tratadas con diferentes concentraciones de vinblastina durante 24 horas.

La Figura 33 muestra las imágenes de microtúbulos en células COS tratadas con diferentes concentraciones

de DBTS durante 4 horas.

La Figura 34 muestra las imágenes de microtúbulos en células COS tratadas con diferentes concentraciones de DBTS durante 24 horas.

La Figura 35 muestra las imágenes de microtúbulos en células COS tratadas con diferentes concentraciones de ACEA100108 durante 4 horas.

La Figura 36 muestra las imágenes de microtúbulos en células COS tratadas con diferentes concentraciones de ACEA100108 durante 24 horas.

La Figura 37 muestra las imágenes de microtúbulos en células COS tratadas con diferentes concentraciones de ACEA100116 durante 4 horas.

La Figura 38 muestra las imágenes de microtúbulos en células COS tratadas con diferentes concentraciones de ACEA100116 durante 24 horas.

La Figura 39a muestra el resultado de los ensayos de ensamblaje de microtúbulos *in vitro* utilizando tubulina pura (libre de MAP) y DBTS.

La Figura 39b muestra las imágenes microscópicas electrónicas de los microtúbulos ensamblados *in vitro* en ausencia de cualquier fármaco.

La Figura 39c muestra las imágenes microscópicas electrónicas de los microtúbulos ensamblados *in vitro* en presencia de DBTS 3 μ M.

La figura 40 muestra el resultado de los ensayos de ensamblaje de microtúbulos *in vitro* utilizando tubulina pura (libre de MAP) y ACEA100108.

La Figura 41 muestra el resultado de los ensayos de ensamblaje de microtúbulos *in vitro* utilizando tubulina pura (libre de MAP) y ACEA100116.

La Figura 42 muestra las imágenes del microscopio fluorescente de tinción de 6-CFDA (panel superior) y anexina V (panel inferior) de células de cáncer de pulmón humano A549 tratadas con ACEA100108 1 μ M, paclitaxel 50 nM, vinblastina 10 nM o DMSO durante 24 horas.

La Figura 43 muestra la distribución del ciclo celular de las células de cáncer de pulmón humano A549 después de que se trataron con ACEA100108 25 μ M, paclitaxel 7,8 nM o DMSO durante 24 horas, según se analizó en una citometría de flujo.

Modos de llevar a cabo la invención

Para mayor claridad de descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las subsecciones que siguen.

A. Definición

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Todas las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones a las que se hace referencia en la presente memoria se mencionan a modo de referencia. Si una definición establecida en esta sección es contraria o contradictoria a una definición establecida en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones que se mencionan en la presente memoria, la definición establecida en esta sección prevalecerá sobre la definición establecida en la patente, solicitud, solicitud u otra publicación mencionada.

Según se utiliza en la presente memoria, "un", "uno" o "una" significa "al menos uno" o "uno o más".

El término "alquilo", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a grupos hidrocarbonados saturados en una configuración lineal, ramificada o cíclica y los grupos alquilo particularmente contemplados incluyen grupos alquilo inferiores (es decir, los que tienen diez o menos átomos de carbono). Los ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, butilo terciario, pentilo, isopentilo, hexilo, etc. El término "alqueno", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un alquilo como se definió anteriormente y que tiene al menos un doble enlace. Por tanto, los grupos alqueno particularmente contemplados incluyen grupos alqueno lineales, ramificados o cíclicos que tienen de dos a diez átomos de carbono (p.ej., etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, etc.). De forma similar, el término "alquino" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un alquilo o alqueno como se definió anteriormente y que tiene al menos un triple enlace. Los alquinos especialmente contemplados incluyen alquinos lineales, ramificados o cíclicos que tienen de dos a diez átomos de carbono totales (p.ej., etinilo, propinilo, butinilo, etc.).

El término "cicloalquilo" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un alcano cíclico (es decir, en donde una cadena de átomos de carbono de un hidrocarburo forma un anillo), que incluye preferiblemente de tres a ocho átomos de carbono. Por lo tanto, ejemplos de cicloalcanos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. Los cicloalquilos también incluyen uno o dos dobles enlaces, que forman los grupos "cicloalqueno". Los grupos cicloalquilo también están sustituidos adicionalmente por alquilo, alqueno, alquino, halo y otros grupos generales.

El término "arilo" o "radical aromático" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un sistema anular aromático, que puede incluir además uno o más átomos que no son de carbono. Por lo tanto, los grupos arilo contemplados incluyen (p.ej., fenilo, naftilo, etc.) y piridilo. Otros grupos arilo contemplados pueden estar fusionados (es decir, unidos covalentemente a 2 átomos en el primer anillo aromático) con uno o dos grupos arilo o heterocíclico de 5 o 6 miembros, y por tanto se denominan "arilo fusionado" o "aromático fusionado".

Según se utiliza también en la presente memoria, los términos "heterociclo", "cicloheteroalquilo" y "radicales heterocíclicos" se utilizan indistintamente en la presente memoria y se refieren a cualquier compuesto en donde una pluralidad de átomos forman un anillo a través de una pluralidad de enlaces covalentes, en donde el anillo incluye al menos un átomo que no sea un átomo de carbono. Las bases heterocíclicas particularmente contempladas incluyen anillos de 5 y 6 miembros con nitrógeno, azufre u oxígeno como átomo que no es de carbono (p.ej., imidazol, pirrol, triazol, dihidropirimidina, indol, piridina, tiazol, tetrazol, etc.). Se pueden fusionar heterociclos contemplados adicionales (es decir, unidos covalentemente con dos átomos en el primer anillo heterocíclico) a uno o dos anillos o heterociclos, y por tanto se denominan "heterociclo fusionado" o "base heterocíclica fusionada" o "radicales heterocíclicos fusionados" según se utiliza en la presente memoria.

El término "alcoxi" según se utiliza en la presente memoria se refiere a alquilo lineal o ramificado que se conecta a un átomo de oxígeno denominado alcóxido, en donde la porción hidrocarbonada puede tener cualquier número de átomos de carbono, puede incluir un enlace doble o triple y puede incluir uno o dos átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno en las cadenas alquílicas. Por ejemplo, los grupos alcoxi adecuados incluyen metoxi, etoxi, propiloxi, isopropoxi, metoxietoxi, etc. De forma similar, el término "alquiltio" se refiere a alquilsulfuros de cadena lineal o ramificada, en donde la porción hidrocarbonada puede tener cualquier número de átomos de carbono, puede incluir adicionalmente un doble o triple enlace y puede incluir uno o dos átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno en las cadenas alquílicas. Por ejemplo, los grupos alquiltio contemplados incluyen metiltio, etiltio, isopropiltio, metoxietiltio, etc.

Asimismo, el término "alquilamino" se refiere a alquilaminas lineales o ramificadas, en las que el nitrógeno amínico "N" puede estar sustituido con uno o dos alquilos y la porción hidrocarbonada puede tener cualquier número de átomos de carbono y adicionalmente puede incluir un enlace doble o triple. Además, el hidrógeno del alquilamino puede estar sustituido con otro grupo alquilo. Por lo tanto, los grupos alquilamino ilustrativos incluyen metilamino, dimetilamino, etilamino, dietilamino, etc.

El término "ariloxi" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo arilo que se conecta a un átomo de oxígeno, en donde el grupo arilo puede estar sustituido adicionalmente. Por ejemplo, los grupos ariloxi adecuados incluyen feniloxi, etc. De forma similar, el término "ariltio" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo arilo que se conecta a un átomo de azufre, en donde el grupo arilo puede estar sustituido adicionalmente. Por ejemplo, los grupos ariltio adecuados incluyen feniltio, etc.

El término "halógeno" según se utiliza en la presente memoria se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "aminoácido" según se utiliza en la presente memoria se refiere a aminoácidos naturales y no naturales sustituidos con configuración D o L o la mezcla en la que se utilizan grupos amino y ácido para derivatizar los compuestos contemplados.

Se debe reconocer adicionalmente que todos los grupos definidos anteriormente pueden estar sustituidos adicionalmente con uno o más sustituyentes, que a su vez pueden ser sustituidos también. Por ejemplo, un "alquilo" según se utiliza en la presente memoria abarca alquilos sustituidos con un heteroátomo.

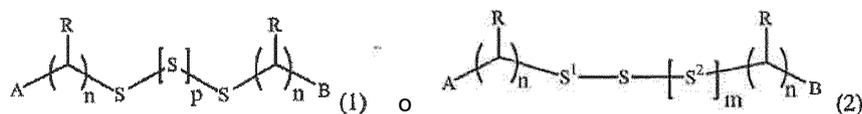
El término "sustituido", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un reemplazo de un átomo o grupo químico (p.ej., H, NH₂, u OH) por un grupo funcional, y particularmente los grupos funcionales contemplados incluyen grupos nucleofílicos (p.ej., -NH₂, -OH, -SH, -NC, etc.), grupos electrofílicos (p.ej., C(O)OR, C(X)OH, etc.), grupos polares (p.ej., -OH), grupos no polares (p.ej., heterociclo, arilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, etc.), grupos iónicos (p.ej., -NH₃⁺) y halógenos (p.ej., -F, -Cl), NHCOR, NHCONH₂, OCH₂COOH, OCH₂CONH₂, OCH₂CONHR, NHCH₂COOH, NHCH₂CONH₂, NHSO₂R, OCH₂-heterociclos, PO₃H, SO₃H, aminoácidos, y diversas combinaciones conocidas en la técnica. Además, el término "sustituido" también incluye múltiples grados de sustitución, y cuando se describen o reivindican múltiples sustituyentes, el compuesto sustituido puede estar sustituido independientemente con uno o más de los radicales sustituyentes descritos o reivindicados.

El término "derivado orgánico de azufre" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto orgánico que contiene dos o más átomos de "S". El término "disulfuro", "trisulfuro", "tetrasulfuro" o pentasulfuro según se utiliza en la presente memoria se refiere a un radical donde dos, tres, cuatro o cinco átomos de azufre se conectan en una cadena lineal (-S-S-S-), donde uno o dos o tres de ellos pueden oxidarse adicionalmente a S=O o SO₂, y donde los derivados di-, tri-, tetra- y penta-sulfuro están sustituidos con dos grupos funcionales, arilo, alquenilo, heterocíclicos o sustituyentes en los dos extremos del di-, tri-, tetra- y penta-sulfuro (RS-(S)O-3-SR). Dos o más

radicales trisulfuro (-S-S-S-) se pueden conectar entre sí mediante una cadena aromática o lineal, que también se refiere a "trisulfuro" u organosulfuro. Uno o dos radicales trisulfuro u organosulfuro pueden estar conectados entre sí para formar sistemas anulares cíclicos.

5 **B. Derivados de azufre orgánico sustituidos y composiciones farmacéuticas de los mismos**

La presente descripción proporciona compuestos que tienen fórmula



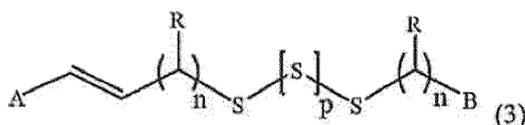
en donde A y B son iguales o diferentes, y son independientemente un arilo, heteroarilo opcionalmente sustituido, o un anillo de 5-14 miembros que puede ser monocíclico o multicíclico y que contiene opcionalmente un heteroátomo; cada S está opcionalmente en forma de un óxido;

S¹ y S² son independientemente S, SO o SO₂;

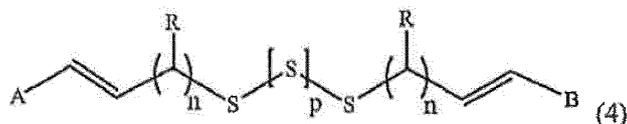
15 cada R es H, halógeno, carboxilo, ciano, amino, amido, un aminoácido, un sustituyente inorgánico, SR¹, OR¹ o R¹, en donde cada R¹ es alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, un anillo carbocíclico o un anillo heterocíclico, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido y puede contener un heteroátomo;

m, n y p son independientemente 0-3;

o un compuesto que tiene la fórmula (3) o (4):

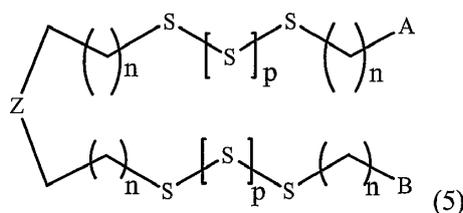


o



25 donde A, B, R, S, n y p se definen como antes;

o un compuesto que tiene la fórmula (5):



en donde A, B, S, n y p se definen como antes; y

30 Z es (CR¹)_q o (CR¹=CR¹)_q* en donde q es 0-3 y * representa que C=C se puede reemplazar por alquinilo, O, S, NR;

o Z es un anillo arilo, heteroarilo o heterociclo opcionalmente sustituido;

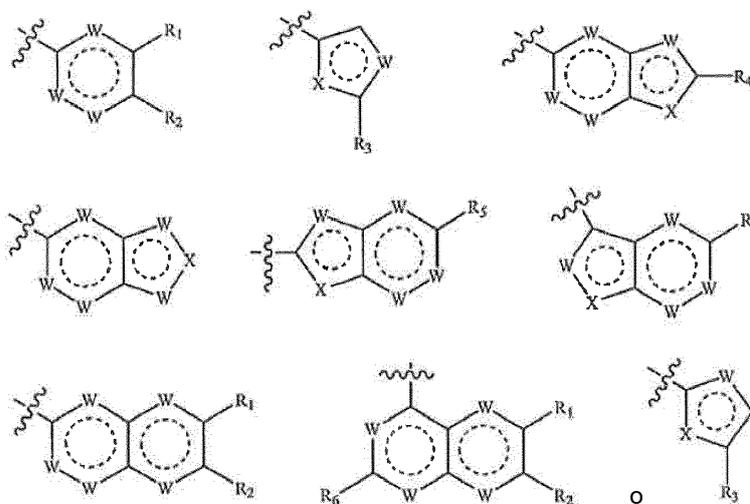
donde A y B juntos pueden formar un sistema anular cíclico;

y una sal, éster, profármaco o metabolito farmacéuticamente aceptable del mismo;

35 siempre que dicho compuesto no sea trisulfuro de dibencilo, trisulfuro de di(p-clorobencilo), benciltrisulfuro de (p-clorobencilo), trisulfuro de di(p-nitrobencilo), trisulfuro de di(3-fenil-2-propenilo), trisulfuro de difenilo o trisulfuro de di(p-t-butilfenilo).

En otras realizaciones, cada R en la fórmula 1-5 anterior puede ser un sustituyente no interferente. En general, un "sustituyente no interferente" es un sustituyente cuya presencia no destruye la capacidad de un compuesto para comportarse como un agente terapéutico. Por ejemplo, un sustituyente no interferente puede mejorar la potencia y las propiedades de PK. En otro ejemplo, el sustituyente no interferente puede reducir la toxicidad. Los sustituyentes no interferentes adecuados incluyen halo, nitro, carboxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, arilalquenilo, alcoxi, alquiltio, arilalquinilo, heterociclos, aminoácidos, cada uno de los cuales puede estar sustituido adicionalmente con uno o más sustituyentes no interferentes. Los sustituyentes no interferentes también pueden incluir COOR, SR, OR, en donde R es también un sustituyente que no interfiere, como se definió anteriormente.

En la fórmula anterior 1-5, A y B pueden ser independientemente



5

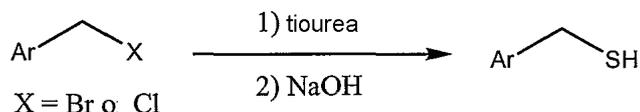
donde X y W son independientemente S, O, NR₇, CR₇;
 o un W en un anillo monocíclico o bicíclico de 6 miembros puede ser un enlace; y
 10 cada R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ se define como antes.

En otras realizaciones, cada R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ puede ser un sustituyente polar o no polar. En otros ejemplos, cada R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ puede ser un sustituyente nucleofílico o electrofílico no interferente.

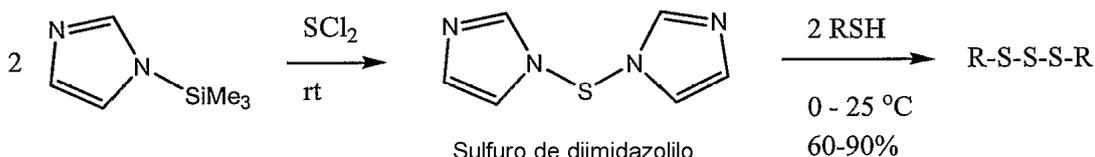
15 La presente invención también abarca compuestos que tienen una fórmula como la mencionada anteriormente, así como sus sales. Tales sales, por ejemplo, pueden formarse a partir de un grupo sustituido con carga positiva (p.ej. un grupo amino en A y/o B) en un compuesto y un anión farmacéuticamente adecuado. Los aniones adecuados incluyen, pero no se limitan a, cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, nitrato, fosfato, citrato, metanosulfonato, trifluoroacetato, maleato y acetato. Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden formar a partir de un
 20 grupo sustituido con carga negativa (p.ej., grupo carboxilato en A y/o B) en un compuesto y un catión. Los ejemplos no limitantes de cationes adecuados son ion sodio, ion potasio, ion magnesio, ion calcio y un ion amonio orgánico tal como ion tetrametilamonio, ion tetrabutilamonio y otros cationes orgánicos.

25 Los trisulfuros se pueden sintetizar siguiendo procedimientos como se ilustra en el Esquema 1. Por ejemplo, los haluros de metileno aromáticos o heterocíclicos (X = I o Br o Cl) se hacen reaccionar con tiourea. Los halogenuros de isotiuronio resultantes se tratan con hidróxido de sodio para proporcionar los derivados de tiol correspondientes (Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Rogers, V.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A.R. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, Longman Group Limited, Londres, 1978, pág. 582-583).

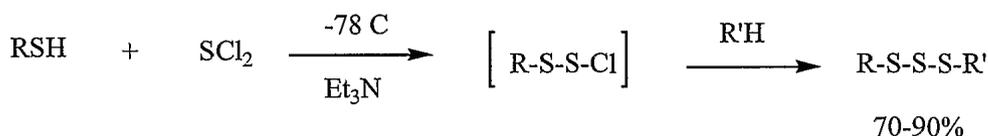
Síntesis de derivados de tiol



Método A: Síntesis de trisulfuros simétricos



Método B: Síntesis de trisulfuros simétricos o asimétricos



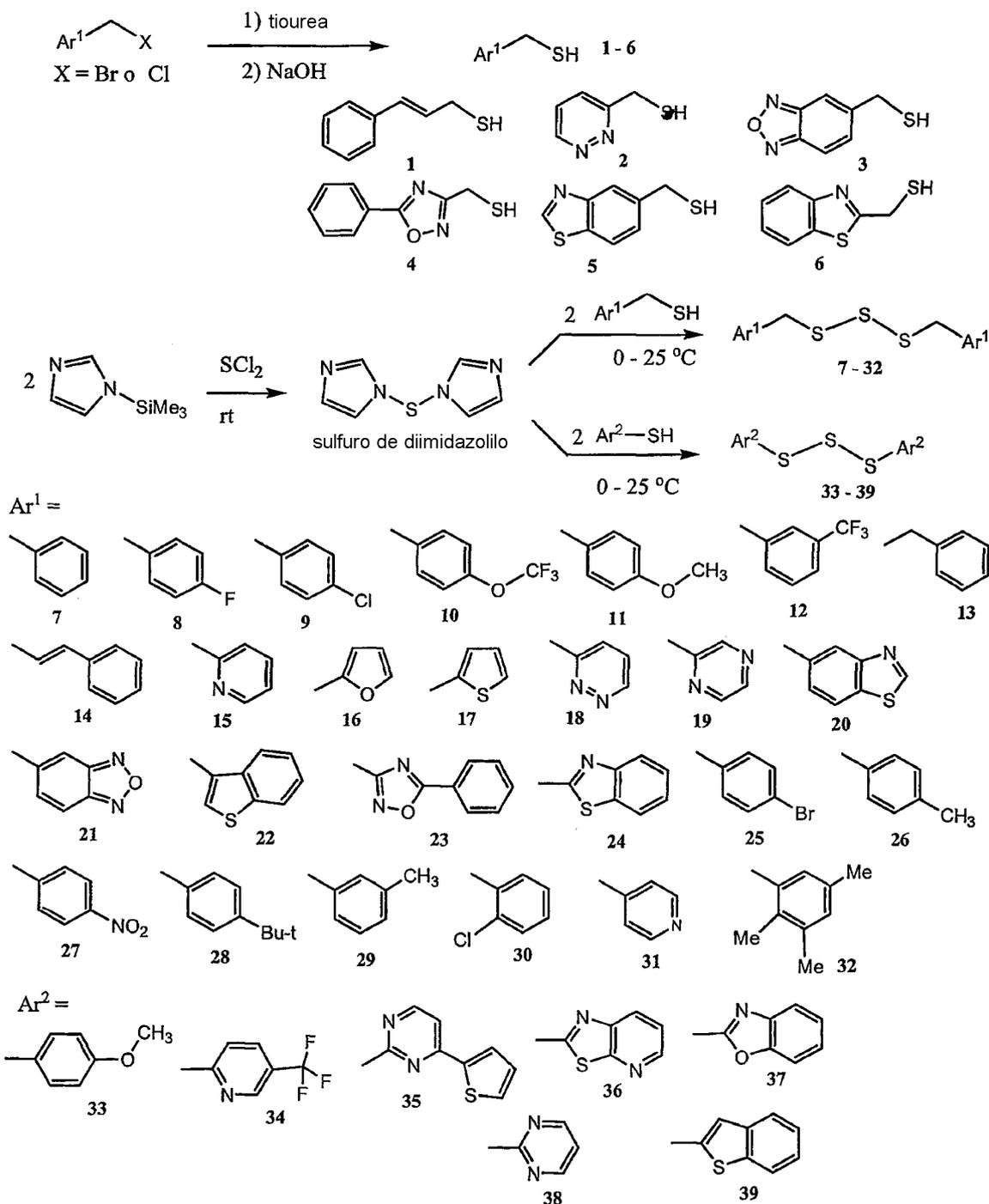
Esquema 1. Métodos sintéticos para los trisulfuros simétricos y asimétricos

Los derivados simétricos de trisulfuro pueden sintetizarse utilizando el Método A. En el Método A, se hace reaccionar *N*-trimetilsililimidazol con dicloruro de azufre. El sulfuro de diimidazolilo resultante se hace reaccionar a continuación con tiol para proporcionar los trisulfuros correspondientes. El Método B se puede utilizar para sintetizar trisulfuros simétricos y asimétricos. En el Método B, el primer tiol se hace reaccionar con dicloruro de azufre cuantitativamente a baja temperatura. El cloruro de tiosulfenilo intermedio resultante se hace reaccionar a continuación con el segundo tiol para proporcionar el trisulfuro asimétrico o simétrico deseado, dependiendo del tiol utilizado en el segundo paso.

- Los metil tioles aromáticos representativos **1-6** (Esquema 2) se pueden sintetizar utilizando el procedimiento similar descrito en Vogel's Practical Organic Chemistry, pág. 582-583. Además, se sintetizaron derivados simétricos de trisulfuro **7-32** (Esquema 2) mediante el Método A similar al procedimiento referido (Banerji, A.; Kalena, G. P. Tetrahedron Letters 1980, 21, 3003-3004). Por ejemplo, se añadió dicloruro de azufre (14 mmoles) en hexanos anhidros o diclorometano a una solución agitada de *N*-trimetilsililimidazol (28 mmoles) en hexanos a temperatura ambiente. Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla de reacción se enfrió a 0°C, y se añadió gota a gota una solución de tiol designado (28 mmoles) en hexanos anhidros durante un período de 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos, y el subproducto de imidazol precipitado se separó por filtración. El filtrado se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se evaporó, y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice utilizando hexanos-acetato de etilo 100:1 a 20:1 como eluyente para proporcionar los trisulfuros deseados **7-32** con rendimientos de 60-90%. Los trisulfuros aromáticos **33-39** fueron sintetizados mediante el procedimiento similar con rendimientos de 30-70%.

Trisulfuro de di(*p*-fluorobencilo) (8). El trisulfuro **8** fue sintetizado con un rendimiento de 77%. La sustancia cristalina de color blanco se obtuvo mediante purificación cromatográfica seguida de recristalización en hexanos. TLC en gel de sílice $R_f = 0,46$ (hexanos-acetato de etilo 40:1). RMN ^1H (499,1 MHz, CDCl_3) δ 4,00 (s, 4 H), 7,01 (t, 4 H, $J = 8,8$ Hz), 7,27 (dd, 4H, $J = 8,8, 5,4$ Hz); RMN ^{13}C (125,7 MHz, CDCl_3) δ 42,4, 115,6, 115,8, 131,2, 131,3, 132,4, 162,5 (C-F, $J = 250$ Hz); RMN ^{19}F (376,5 MHz, CDCl_3) δ -114,2; ES MS m/z 337/338 (M + Na) $^+$; Anál. Calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{S}_3$: C, 53,48; H, 3,85; S, 30,59. Encontrado: C, 53,16; H, 4,22; S, 30,24.

- Trisulfuro de di(*p*-clorobencilo) (9).** (No forma parte de la invención) El trisulfuro **9** se sintetizó con un rendimiento de 90%. La sustancia cristalina de color blanco se obtuvo mediante purificación cromatográfica seguido de recristalización en hexanos. TLC en gel de sílice $R_f = 0,45$ (hexanos-acetato de etilo 40:1). RMN ^1H (499,1 MHz, CDCl_3) δ 3,98 (s, 4H), 7,22 (d, 4H, $J = 8,4$ Hz), 7,29 (d, 4H, $J = 8,4$ Hz).



Esquema 2. Síntesis de los trisulfuros simétricos mediante el Método A

5 (Solamente los compuestos 8, 10, 12, 15-25 y 31 entran dentro del alcance de la invención).

10 **Trisulfuro de di(*m*-trifluorometilbencilo) (12)**. El trisulfuro **12** se sintetizó con un rendimiento de 99%. La sustancia cristalina de color blanco se obtuvo mediante purificación cromatográfica seguido de recrystalización en hexanos. TLC en gel de sílice $R_f = 0,33$ (hexanos-acetato de etilo 40:1). RMN ^1H (499,1 MHz, CDCl_3) δ 4,04 (s, 4H), 7,41-7,49 (m, 4H), 7,51-7,58 (m, 4H).

Trisulfuro de di(benzo[B]tiofen-3-il-metano) (22). El trisulfuro **22** se sintetizó con un rendimiento de 45%. El sólido blanco se obtuvo mediante purificación cromatográfica. TLC en gel de sílice $R_f = 0,45$ (hexanos-acetato de etilo

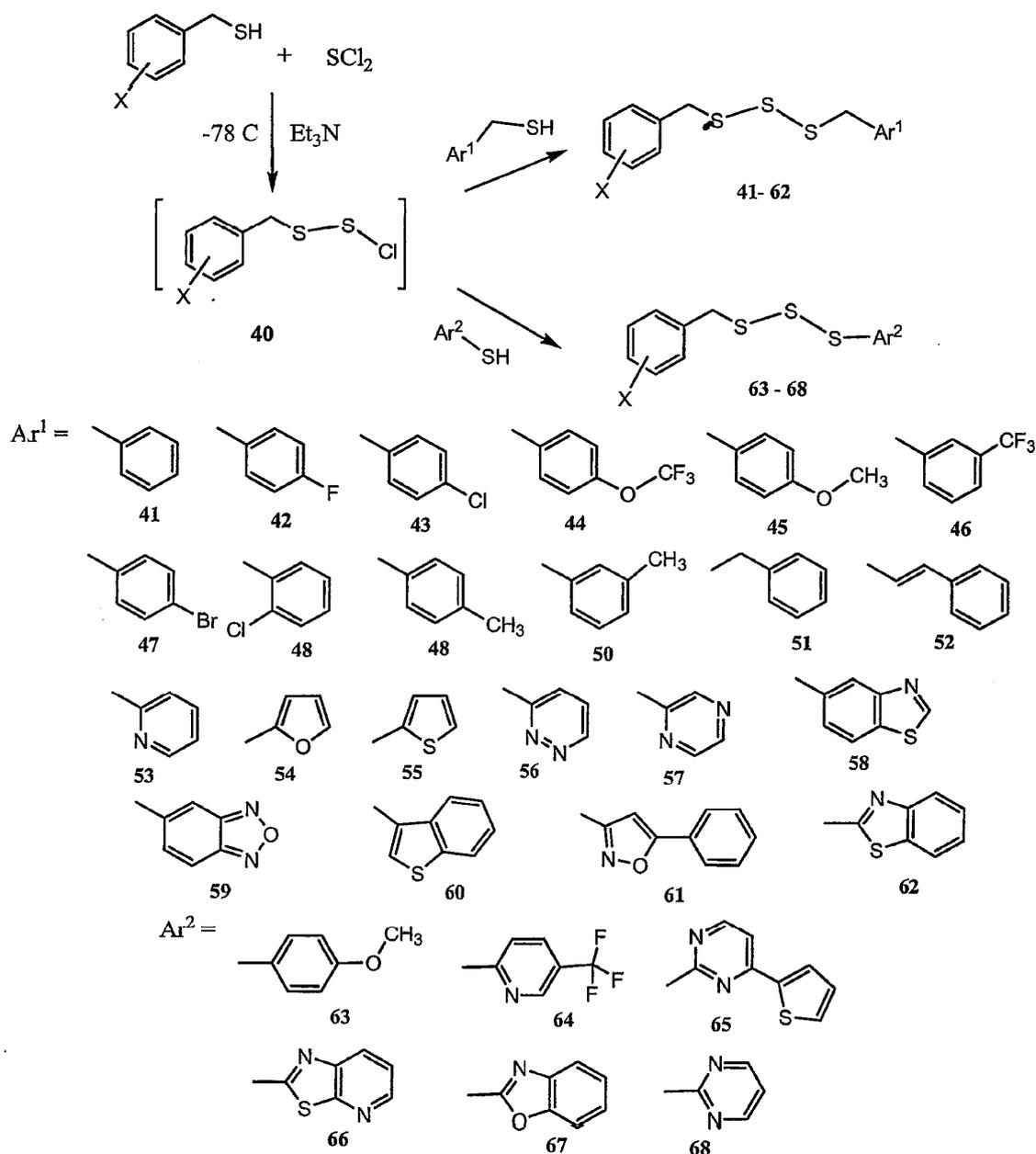
40:1). RMN H^1 (499,1 MHz, $CDCl_3$) δ 3,74 (s, 4H), 7,01 (s, 2H), 7,34 - 7,45 (m, 4H), 7,75 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz), 7.85 (dd, 2H, $J = 7,8, 1,1$ Hz). ES MS m/z 391 (M + H)⁺, 413 (M + Na)⁺.

5 **Trisulfuro de di(p-bromobencilo) (25).** El trisulfuro **25** se sintetizó con un rendimiento de 84%. La sustancia cristalina de color blanco se obtuvo mediante purificación cromatográfica seguido de recristalización en hexanos. TLC en gel de sílice $R_f = 0,55$ (hexanos-acetato de etilo 40:1). RMN H^1 (499,1 MHz, $CDCl_3$) δ 3,96 (s, 4H), 7,17 (d, 4H, $J = 8,3$ Hz), 7,45 (d, 4H, $J = 8,3$ Hz).

10 **Trisulfuro de di(p-metilbencilo) (26).** (No forma parte de la invención) El trisulfuro **26** se sintetizó con un rendimiento de 99%. La sustancia cristalina de color blanco se obtuvo mediante purificación cromatográfica seguido de recristalización en hexanos. TLC en gel de sílice $R_f = 0,66$ (hexanos-acetato de etilo 40:1). RMN H^1 (499,1 MHz, $CDCl_3$) δ 2,33 (s, 6 H), 4,01 (s, 4 H), 7,14 (d, 4 H, $J = 8,0$ Hz), 7,21 (d, 4H, $J = 8,0$ Hz).

15 **Trisulfuro de di(p-t-butilbencilo) (28).** (No forma parte de la invención) El trisulfuro **28** se sintetizó con un rendimiento de 96%. La sustancia cristalina de color blanco se obtuvo mediante purificación cromatográfica seguido de recristalización en hexanos. TLC en gel de sílice $R_f = 0,50$ (hexanos-acetato de etilo 40:1). RMN H^1 (499,1 MHz, $CDCl_3$) δ 1,30 (s, 18 H), 4,02 (s, 4 H), 7,25 (d, 4 H, $J = 8,3$ Hz), 7,35 (d, 4H, $J = 8,3$ Hz).

20 **Trisulfuro de di(o-clorobencilo) (30).** (No forma parte de la invención) El trisulfuro **30** se sintetizó con un rendimiento de 77%. La sustancia cristalina de color blanco se obtuvo mediante purificación cromatográfica seguido de recristalización en hexanos. TLC en gel de sílice $R_f = 0,44$ (hexanos-acetato de etilo 40:1). RMN H^1 (499,1 MHz, $CDCl_3$) δ 4,17 (s, 4H), 7,23-7,28 (m, 4H), 7,35-7,43 (m, 4H).



Esquema 3. Síntesis de los trisulfuros no simétricos mediante el Método B

5 (No forman parte de la invención)

10 **Trisulfuro de di(2,4,6-trimetilbencilo) (32).** (No forma parte de la invención) El trisulfuro **32** se sintetizó con un rendimiento de 59%. La sustancia cristalina de color blanco se obtuvo mediante purificación cromatográfica seguido de recristalización en hexanos. TLC en gel de sílice $R_f = 0,65$ (hexanos-acetato de etilo 40:1). RMN H^1 (499,1 MHz, $CDCl_3$) δ 2,27 (s, 6 H), 2,42 (s, 12 H), 4,23 (s, 4 H), 6,87 (s, 4 H).

15 **Trisulfuro de di(p-metoxifenilo) (33).** (No forma parte de la invención) El trisulfuro **33** se sintetizó con un rendimiento de 98%. La sustancia cristalina de color blanco se obtuvo mediante purificación cromatográfica seguido de recristalización en hexanos. TLC en gel de sílice $R_f = 0,32$ (hexanos-acetato de etilo 20:1). RMN H^1 (499,1 MHz, $CDCl_3$) δ 3,80 (s, 4 H), 6,81 (d, 4 H, $J = 8,8$ Hz), 7,47 (d, 4H, $J = 8,8$ Hz).

Trisulfuro de di(4-trifluorometilpiridin-2-ilo) (34). (No forma parte de la invención) El trisulfuro **34** se sintetizó con un rendimiento de 53%. La sustancia cristalina de color blanco se obtuvo mediante purificación cromatográfica seguido de recristalización en hexanos. TLC en gel de sílice $R_f = 0,61$ (hexanos-acetato de etilo 10:1). RMN H^1

(499,1 MHz, CDCl_3) δ 7,70 (d, 4H, $J = 8,4$ Hz), 7,84 (dd, 4H, $J = 8,4, 2,4$ Hz), 8,73 (s, 2H).

Los derivados asimétricos de trisulfuro enumerados en las tablas 1-8 pueden sintetizarse siguiendo procedimientos similares a los compuestos **41-68**, (No forman parte de la invención) utilizando el tiol correspondiente.

5

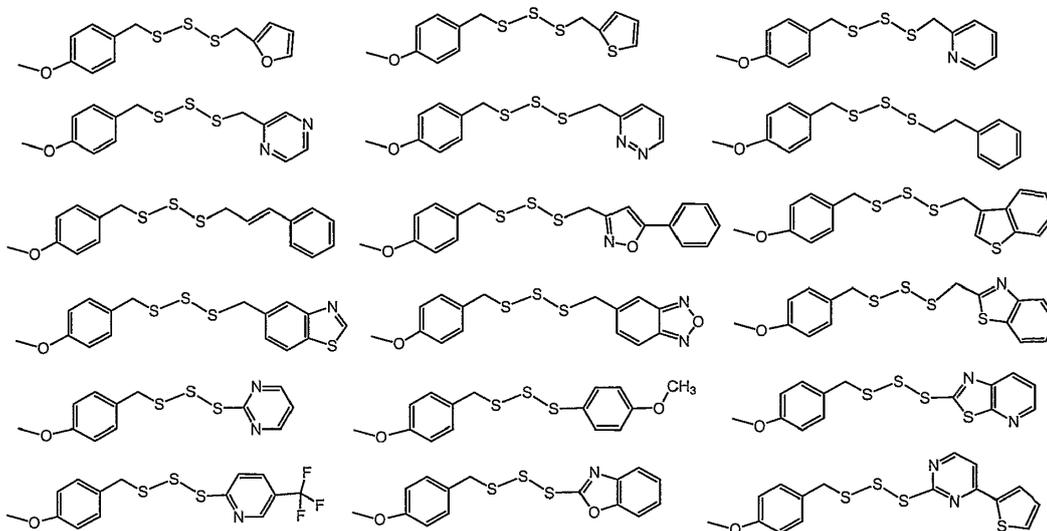


Tabla 1. Diversos derivados trisulfuro disustituidos

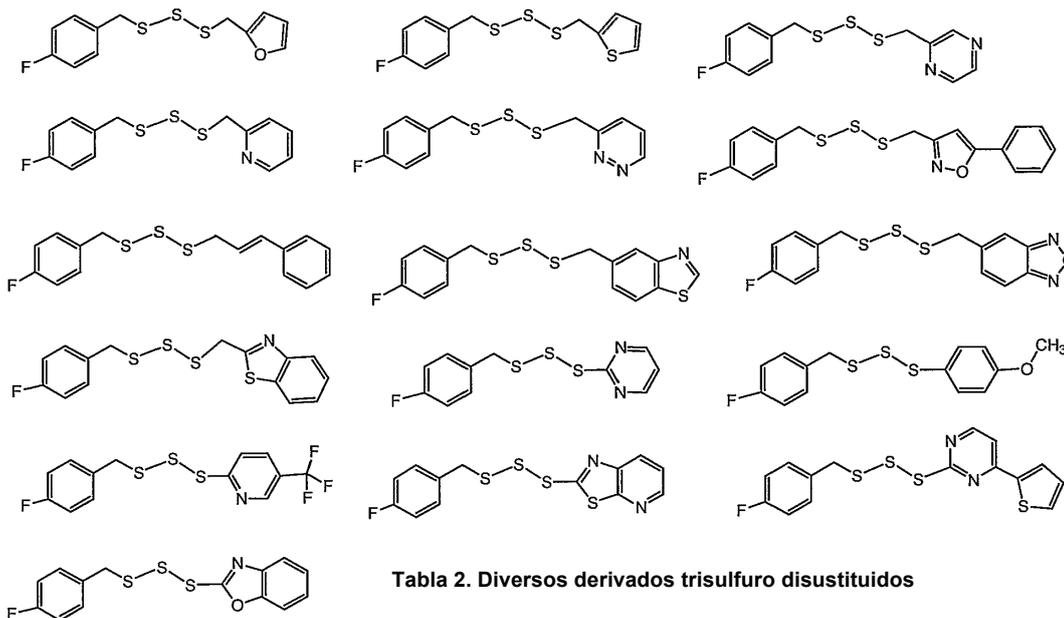


Tabla 2. Diversos derivados trisulfuro disustituidos

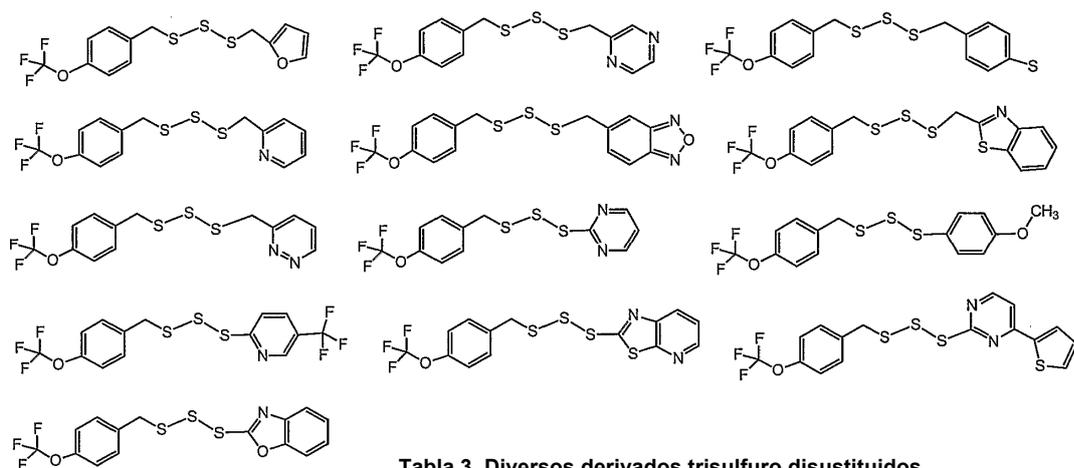


Tabla 3. Diversos derivados trisulfuro disustituidos

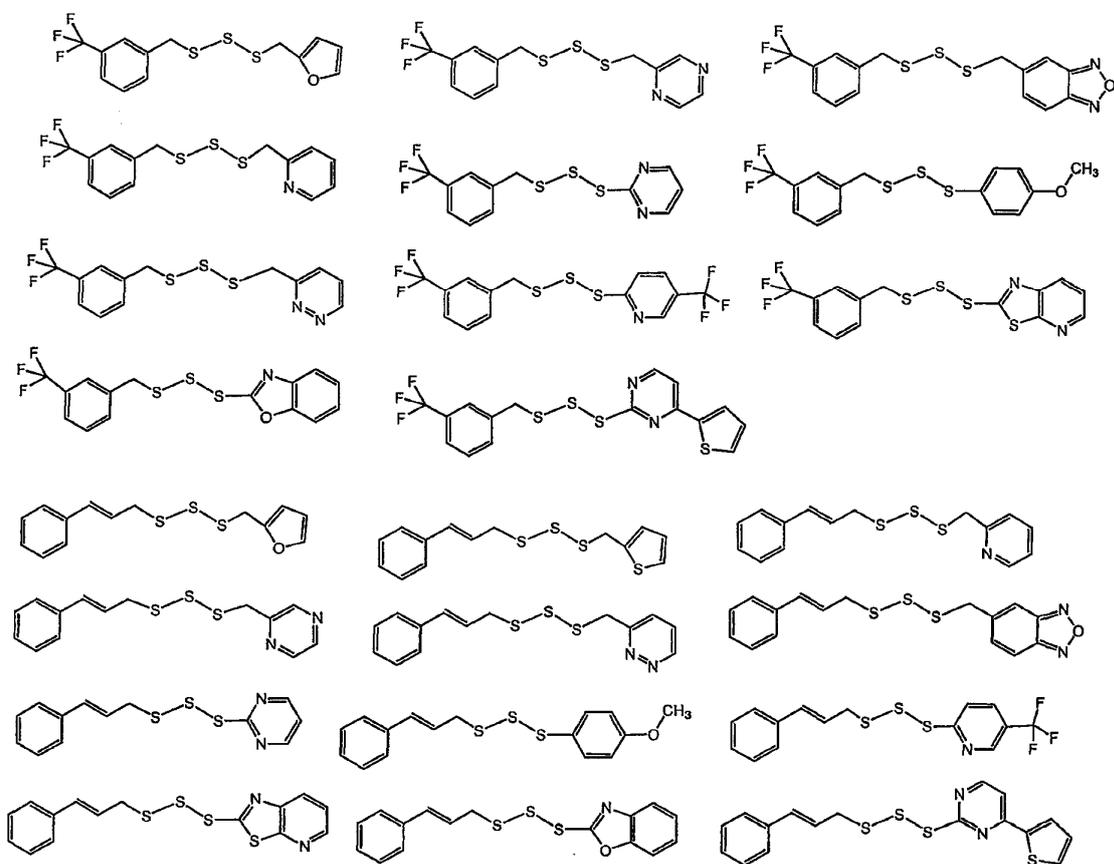


Tabla 4. Diversos derivados trisulfuro disustituidos

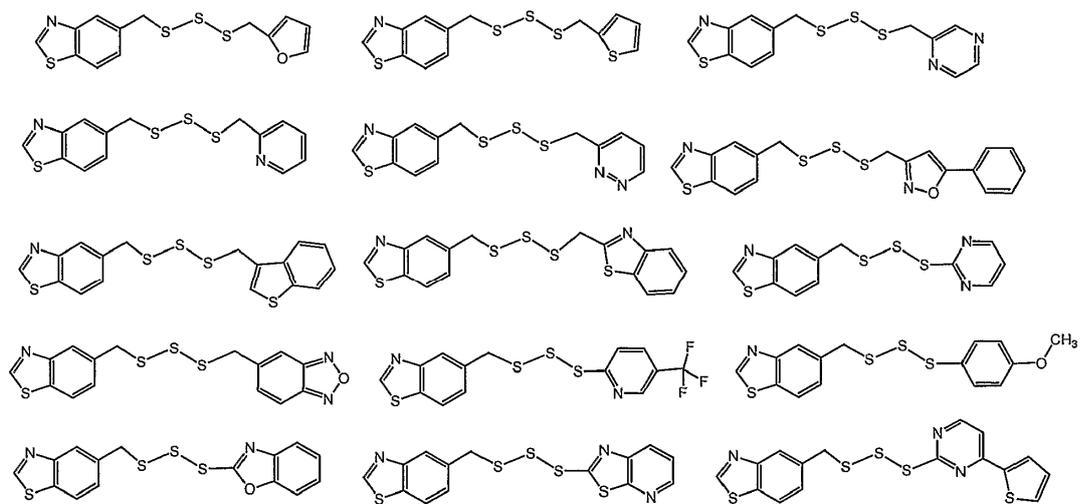


Tabla 5. Diversos derivados trisulfuro disustituidos

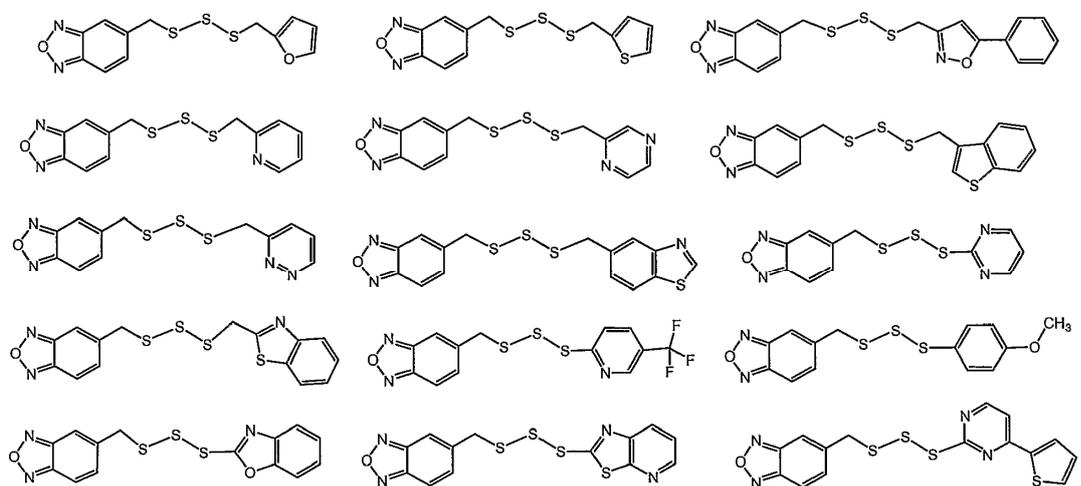
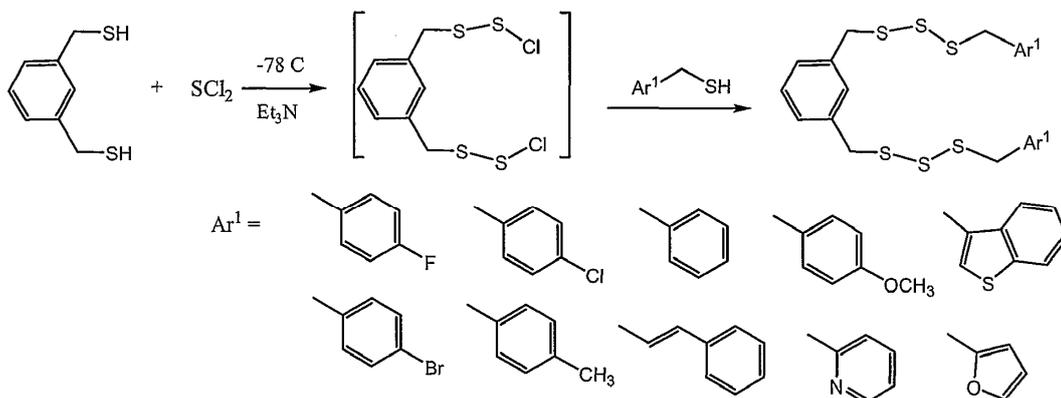


Tabla 6. Diversos derivados trisulfuro disustituidos

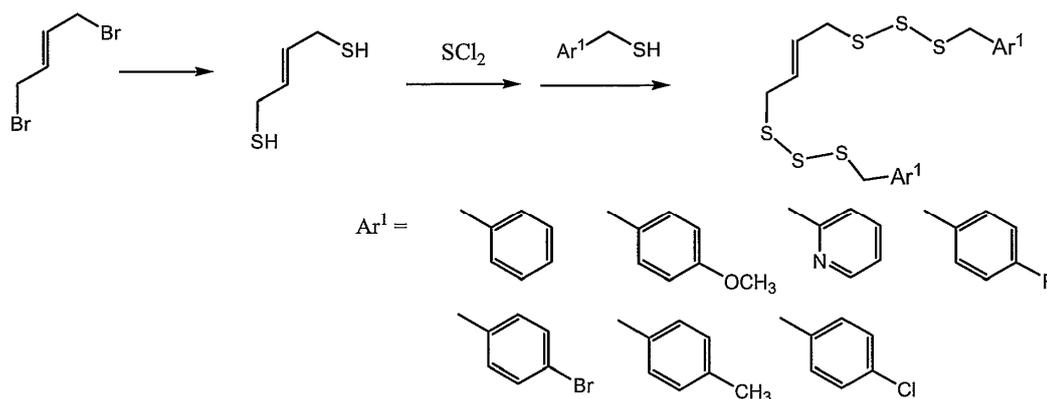
añade gota a gota durante un período de 30 minutos a una solución agitada fría (-78°C) de dicloruro de azufre (20 mmoles) en 80 mL de éter dietílico anhidro. La mezcla de reacción se agita durante 30 minutos. El segundo tiol correspondiente (20 mmoles) y piridina anhidra (20 mmoles) en 40 mL de éter dietílico se añaden gota a gota durante un período de 30 minutos a -78°C, y la mezcla de reacción se agita otra vez durante 30 minutos adicionales. La mezcla de reacción se lava con agua (2 veces), una solución de hidróxido de sodio 1 N (2 veces) y a continuación agua (2 veces) hasta que el pH es neutro. La fase orgánica se seca sobre CaCl₂ o sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra. El residuo se pasa a través de un lecho corto de gel de sílice utilizando hexanos-acetato de etilo como eluyente para proporcionar trisulfuros di-sustituidos con rendimientos de 40-90%.

5



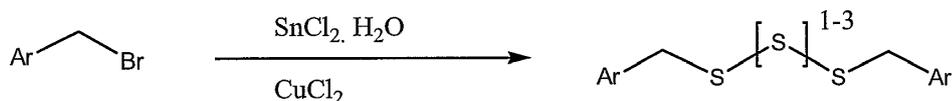
10

Esquema 4. Síntesis de derivados bis(trisulfuro)



15

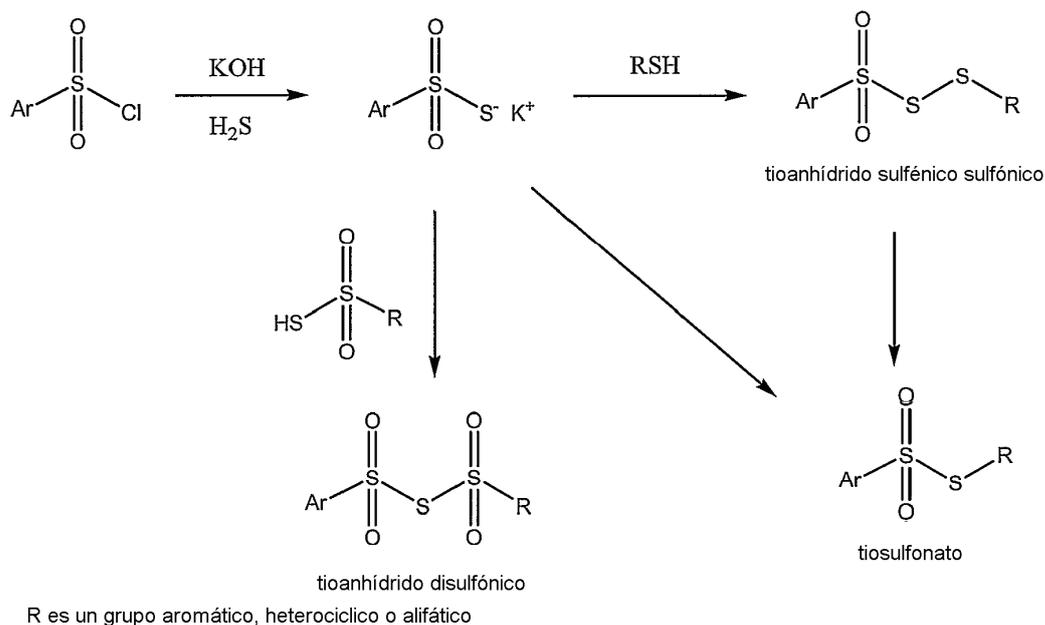
Esquema 5. Síntesis de derivados bis(trisulfuro)



Esquema 6. Síntesis de derivados tri-, tetra- y penta-sulfuro

20

Los derivados trisulfuro pueden sintetizarse mediante los métodos descritos anteriormente o mediante el enfoque ilustrado en el Esquema 6. Los derivados tetra y penta-sulfuro se sintetizan mediante una estrategia similar basada en el procedimiento referido (Sinha, P.; Jundu, A.; Roy, S.; Prabhakar, S.; Vairamani, M.; Sankar, A. R.; Kunwar, A. C. *Organometallics* 2001, 20, 157-162).



Esquema 7. Síntesis de derivados tioanhídrido sulfénico sulfónico, tiosulfonato, y tioanhídrido disulfónico

Los derivados tioanhídrido sulfénico sulfónico simétricos o asimétricos (Esquema 7) pueden sintetizarse basándose en los procedimientos referidos (Karpp, D. N.; Gleason, J. G.; Ash, D. K. J. Org. Chem. 1971, 36, 322-326; y Harpp, D. N.; Ash, D. K.; Smith, R. A. J. Org. Chem. 1979, 44, 4135-4140).

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un compuesto que tiene una fórmula como se describe en la presente memoria opcionalmente con un agente antiproliferativo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Según se utiliza en la presente memoria, una "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto que se requiere para conferir un efecto terapéutico sobre el sujeto tratado. La cantidad o dosis eficaz variará según lo reconozcan los expertos en la técnica, dependiendo de los tipos de tumores tratados, la vía de administración y la posible administración conjunta con otros tratamientos terapéuticos tales como el uso de otros agentes antitumorales o radioterapia.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "agente antiproliferativo" se refiere a un agente terapéutico que puede utilizarse para tratar o mejorar un trastorno proliferativo celular tal como tumores o cáncer. Los ejemplos de agentes antiproliferativos incluyen, pero no se limitan a, un agente antineoplásico, un agente alquilante, un alcaloide vegetal, un agente antimicrobiano, una sulfonamida, un agente antiviral, un agente de platino y otros agentes anticancerosos conocidos en la técnica. Los ejemplos concretos de agentes antiproliferativos incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, carboplatino, busulfano, metotrexato, daunorrubicina, doxorrubicina, ciclofosfamida, melfalán, vincristina, vinblastina, clorambucilo, paclitaxel, gemcitabina y otros conocidos en la técnica. (Véanse, p.ej., Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics (9ª edición) (Goodman, et al., Eds.) (McGraw-Hill) (1996); y 1999 Physician's Desk Reference (1998)).

Se puede preparar cualquier formulación adecuada de los compuestos descritos en la presente memoria. En los casos en que los compuestos son suficientemente alcalinos o ácidos para formar sales de ácidos o bases no tóxicas estables, puede ser apropiada la administración de los compuestos en forma de sales. Los ejemplos de las sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de ácidos orgánicos formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato y α -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, que incluyen sales hidrocioruro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato. Las sales farmacéuticamente aceptables se obtienen utilizando procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un compuesto suficientemente alcalino tal como una amina con un ácido adecuado, proporcionando un anión fisiológicamente aceptable. también se preparan sales de ácidos carboxílicos de metales alcalinos (p.ej., sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (p.ej., calcio).

Los compuestos que tienen una fórmula como se describe en la presente memoria son generalmente solubles en disolventes orgánicos tales como cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, etanol, metanol, isopropanol, acetonitrilo, glicerol, *N,N*-dimetilformamida, *N,N*-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, etc. En una realización, la

- presente invención proporciona formulaciones preparadas mezclando un compuesto que tiene una fórmula como se describe en la presente memoria con un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la formulación puede prepararse utilizando un método que comprende: a) disolver un compuesto de la reivindicación 1 en un disolvente orgánico soluble en agua, un disolvente no iónico, un lípido soluble en agua, una ciclodextrina, una vitamina tal como tocoferol, un ácido graso, un éster de ácido graso, un fosfolípido, o una combinación de los mismos, para proporcionar una solución; y b) añadir solución salina a un tampón que contiene solución de carbohidrato al 1-10%. En un ejemplo, el carbohidrato comprende dextrosa. Las composiciones farmacéuticas obtenidas utilizando los presentes métodos son estables y útiles para aplicaciones en animales y clínicas.
- Los ejemplos ilustrativos de disolventes orgánicos solubles en agua para uso en los presentes métodos incluyen, entre otros, polietilenglicol (PEG), alcoholes, acetonitrilo, *N*-metil-2-pirrolidona, *N,N*-dimetilformamida, *N,N*-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido o una combinación de los mismos. Los ejemplos de alcoholes incluyen, pero no se limitan a, metanol, etanol, isopropanol, glicerol o propilenglicol.
- Los ejemplos ilustrativos de tensioactivos no iónicos solubles en agua para su uso en los presentes métodos incluyen, pero no se limitan a, triricinoleato de polioxietilenglicol 35, PEG-succinato, polisorbato 20, polisorbato 80, 12-hidroxiestearato de polietilén glicol 660, monooleato de sorbitán, poloxámero, aceite persico etoxilado, glicérido de capril-caproil macrogol-8, éster de glicerol, glicérido caprílico de PEG 6, glicerina, polisorbato de glicol, o una combinación de los mismos. Los ejemplos concretos de tensioactivos no iónicos son CREMOPHOR® modificado con polietilenglicol (triricinoleato de polioxietilenglicol 35), CREMOPHOR® EL, CREMOPHOR® RH40 hidrogenado, CREMOPHOR® RH60 hidrogenado, SOLUTOL® HS (12-hidroxiestearato de polietilenglicol 660), LABRAFIL® (aceite persico etoxilado), LABRASOL® (glicérido de capril-caproil macrogol-8), GELUCIRE® (éster de glicerol) y SOFTIGEN® (glicérido caprílico de PEG 6).
- Los ejemplos ilustrativos de lípidos solubles en agua para su uso en los presentes métodos incluyen, pero no se limitan a, aceites vegetales, triglicéridos, aceites vegetales o una combinación de los mismos. Los ejemplos de aceites lipídicos incluyen, pero no están limitados a aceite de ricino, aceite de ricino polioxilado, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de menta, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de soja, aceite vegetal hidrogenado, aceite de soja hidrogenado, triglicérido de aceite de coco, aceite de semilla de palma y formas hidrogenadas de los mismos, o una combinación de los mismos.
- Los ejemplos ilustrativos de ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos para su uso en los presentes métodos incluyen, pero no se limitan a, ácido oleico, monoglicéridos, diglicéridos, un mono o di-éster de ácido graso de PEG, o una combinación de los mismos.
- Los ejemplos ilustrativos de ciclodextrinas para uso en los presentes métodos incluyen, pero no se limitan a, alfa-ciclodextrina, beta-ciclodextrina, hidroxipropil-beta-ciclodextrina o sulfobutil éter-beta-ciclodextrina.
- Los ejemplos ilustrativos de fosfolípidos para su uso en los presentes métodos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilcolina de soja, o diestearoil fosfatidilglicerol, y formas hidrogenadas de los mismos, o una combinación de los mismos.
- Un experto en la técnica puede modificar las formulaciones dentro de las enseñanzas de la memoria descriptiva para proporcionar numerosas formulaciones para una ruta concreta de administración. En particular, los compuestos pueden modificarse para hacerlos más solubles en agua u otro vehículo. También está dentro del conocimiento práctico normal de la técnica modificar la ruta de administración y el régimen de dosificación de un compuesto concreto con el fin de gestionar la farmacocinética de los presentes compuestos para un efecto beneficioso máximo en un paciente.
- C. Métodos de uso de derivados de organoazufre y composiciones farmacéuticas de los mismos**
- Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden utilizar como agentes citotóxicos y/o citostáticos en el tratamiento del cáncer u otros tipos de enfermedad proliferativa. Estos compuestos pueden funcionar a través de cualquier tipo de mecanismo de acción. Por ejemplo, los compuestos pueden inhibir la progresión G2/M del ciclo celular, lo que eventualmente podría inducir la apoptosis en células tumorales (véase, p.ej., Weung, et al. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 1997, 263, 398-404). Algunos compuestos pueden alterar el ensamblaje de tubulina y otros compuestos pueden alterar el ensamblaje de tubulina, lo que puede inhibir la mitosis celular e inducir la apoptosis celular (véase, p.ej., Panda, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 1997, 94, 10560-10564). Los compuestos también pueden inhibir la proliferación de células endoteliales y el efecto de la angiogénesis (véase, p.ej., Witte, et al. *Cancer Metastasis Rev.* 1998, 17, 155-161).

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular, que comprende cualquier compuesto que tiene la fórmula 1-5, que incluye, pero no se limita a, trisulfuro de dibencilo, trisulfuro de di(p-clorobencilo), benciltrisulfuro de (p-clorobencilo), trisulfuro de di(p-

nitrobenzilo), trisulfuro di(3-fenil-2-propenilo), trisulfuro de difenilo o trisulfuro di(p-t-butilfenilo).

Para poner en práctica el método de la presente invención, los compuestos que tienen una fórmula descrita en la presente memoria y sus composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral, parenteral, mediante inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal, a través de un depósito implantado u otros métodos de administración de fármacos. El término "parenteral" según se utiliza en la presente memoria incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinoval, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal.

Una composición inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleosa inyectable estéril, se puede formular de acuerdo con mecanismos conocidos en la técnica utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se incluyen manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijados estériles se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión (p.ej., mono o diglicéridos sintéticos). Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares. También se pueden utilizar diversos agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se utilizan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras farmacéuticamente aceptables para el propósito de la formulación.

Una composición para administración oral puede ser cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye, pero no se limita a, comprimidos, cápsulas, emulsiones y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los portadores comúnmente utilizados incluyen lactosa y almidón de maíz. También se pueden agregar agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el ingrediente activo se puede suspender o disolver en una fase oleosa combinada con agentes emulsionantes o de suspensión. Si es necesario, se pueden agregar ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes. Se pueden preparar un aerosol nasal o composiciones de inhalación de acuerdo con mecanismos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden preparar en forma de soluciones en, por ejemplo, solución salina, empleando conservantes adecuados (por ejemplo, alcohol bencílico), promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad, y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

Además, los compuestos que tienen una fórmula como la mencionada anteriormente se pueden administrar solos o combinados con otros agentes anticancerosos para el tratamiento de diversos cánceres o afecciones. Las terapias combinadas de acuerdo con la presente invención comprenden la administración de al menos un compuesto de la presente invención o un derivado funcional del mismo y al menos otro ingrediente farmacéuticamente activo. El ingrediente o ingredientes activos y los agentes farmacéuticamente activos se pueden administrar por separado o juntos. Las cantidades de ingrediente o ingredientes activos y agente o agentes farmacéuticamente activos y los tiempos relativos de administración se seleccionarán con el fin de lograr el efecto terapéutico combinado deseado.

En una realización, la presente invención se dirige a un compuesto que tiene una fórmula como la mencionada anteriormente para su uso en un método para tratar o mejorar un cáncer de un tejido u órgano, que incluye, pero no se limita a, leucemia, linfoma, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer del SNC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer renal y otros tipos de enfermedad proliferativa que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto.

En otra realización, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene una fórmula como la mencionada anteriormente para su uso en un método de tratamiento de la reestenosis después de la implantación de un estent coronario para pacientes con enfermedades de la arteria coronaria. Una de las principales causas de reestenosis después de la implantación de un estent coronario en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria es la hiperplasia de la neoíntima que puede ser consecuencia de la proliferación y migración de células musculares lisas y producciones de matriz extracelular (véase, por ejemplo, "Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans", de Farb, A., Sangiorgi, G., Certer, A.J., et al. Circulation, 1999, 99, 44-52). Los compuestos que tienen capacidad antiproliferativa pueden tener un efecto en la reducción del riesgo de reestenosis clínica y angiográfica cuando dichos compuestos se administran con un medio adecuado (véase, por ejemplo, "A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease", de Stone, G. W., Ellis, S.G., Cox, D.A., et al., New Engl. J. Med., 2004, 350, 221-231.) Por lo tanto, el trisulfuro de dibencilo y otros compuestos que tienen la fórmula 1-5 también pueden ser útiles en la inhibición de la proliferación de las células implicadas en la hiperplasia de la neoíntima y, por lo tanto, reducen la incidencia de hiperplasia de la neoíntima y reestenosis.

Se pueden utilizar diversos métodos para administrar eficazmente compuestos que tienen una fórmula como la mencionada anteriormente a su diana, tales como células. Por ejemplo, una composición que comprende trisulfuro de dibencilo, u otro compuesto que tiene una fórmula como la mencionada anteriormente, se puede administrar por vía oral, parenteral o mediante un depósito implantado. En otros ejemplos, se mencionan los enfoques descritos en los siguientes documentos, y también se pueden utilizar: "A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease", de Stone, G. W., Ellis, S. G., Cox, D.A. et al. *New Engl. J. Med.* 2004, 350, 221-231; "A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization", de Morice, M.-C., Serruys, P. W., Sousa, J. E., et al. *New Engl. J. Med.* 2002, 346, 1773-1780; "Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery", de Moses, J. W., Leon, M. B., Popma, J. J., et al. *New Engl. J. Med.* 2003, 349, 1315-1323.

La eficacia anticancerosa del trisulfuro de dibencilo y los análogos de organoazufre sustituidos descritos anteriormente se puede analizar preliminarmente *in vitro* utilizando un panel de líneas celulares de cáncer mediante formatos de análisis de punto final convencionales (véase más abajo la descripción detallada), o mediante sistema de detección de células electrónicas en tiempo real (RT-CES), que proporciona información dinámica de respuesta celular después de la exposición a un agente anticanceroso. Se pueden utilizar varios formatos de análisis de escrutinio basados en células de punto final para el descubrimiento y la validación de agentes anticancerosos. Por ejemplo, el National Cancer Institute (NCI) proporciona un sistema de análisis de citotoxicidad de punto final utilizando un panel de 60 líneas de células cancerosas, que se puede utilizar a gran escala de escrutinio basado en células de agentes anticancerosos. (Véase, p.ej., Monks, A., et al. *J Natl. Inst. Cáncer* 1991, 83, 757-766; Alley, M.C., et al. *Cancer Res.* 1988, 48, 589-601; Shoemaker, R. H., et al. *Prac. Clin. Biol. Res.* 1988, 276, 265-286; y Stinson, et al., *Prac. Am. Assa. Cancer Res.* 1989, 30, 613).

En este método de escrutinio, la suspensión celular que se diluye hasta una concentración de células deseada se agrega a los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos de modo que cada pocillo tenga una solución de aproximadamente 100 microlitros con un número de células entre miles (por ejemplo, 5000) y decenas de miles (por ejemplo, 40.000). El número de células añadidas a los pocillos individuales depende del tipo de célula, el tamaño de la célula y las características de crecimiento celular. Las células de la placa se incuban a 37°C, humedad saturada y atmósfera de CO₂ al 5% en una incubadora de cultivo celular convencional durante aproximadamente 24 horas. Los compuestos de interés se preparan en soluciones de ensayo con concentraciones diluidas seriadamente. En un ejemplo, el factor de dilución en las soluciones diluidas seriadamente es 10 veces (o 2, 3, 4 veces) y cinco (o seis a diez) concentraciones diferentes con una razón de la concentración más alta a la concentración más baja de 10.000. También se pueden utilizar otros factores de dilución y otras concentraciones diferentes. Típicamente, la concentración más alta del compuesto de ensayo es de 10⁻⁴ M. Se añaden aproximadamente 100 microlitros de soluciones de ensayo a cada pocillo a las 24 horas de la siembra celular inicial en los pocillos. Las soluciones de ensayo de cada concentración de compuesto se añaden en al menos dos pocillos con fines de replicación. El compuesto de ensayo se puede disolver en un disolvente orgánico tal como DMSO, y las soluciones de ensayo de 100 microlitros pueden ser una mezcla de solución acuosa con la solución o suspensión a base de disolvente orgánico.

Después de la adición del compuesto, las células se incuban con el compuesto durante 48 horas adicionales a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y humedad saturada. A continuación, las células pueden analizarse para determinar su número de células viables mediante diversos análisis, por ejemplo, el análisis de sulforodamina B (según lo descrito por Rubinstein, L.V., et al. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990, 82, 1113-1118; y Skehan, P., et al. *J. Natl. Inst. Cáncer* 1990, 82, 1107-1112). A continuación, se utiliza un lector de placas para leer las densidades ópticas y un valor de CI₅₀, la concentración de fármaco que causa un 50% de inhibición del crecimiento (o GI)₅₀ valor para enfatizar la corrección para las células contadas a el tiempo cero), se obtiene basándose en las curvas de respuesta a la dosis. Por lo tanto, los valores de GI₅₀ se utilizan para medir el poder inhibitor del crecimiento del compuesto de ensayo. Véanse Boyd, et al en *Cytotoxic Atzticahcer Drugs: Models and Concepts for Drug Discovery and Development*; Vlierote, F. A., Corbett T. H., Baker L. H. (Eds.); Kluwer Academic: Hingham, Mass., 1992, pág. 11-34.

En otro formato de análisis, se analiza un compuesto de ensayo para determinar su citotoxicidad y/o efecto citostático en ciertos tipos de células cancerosas, utilizando métodos de análisis de punto final. Se pueden utilizar células en el panel de células cancerosas del NCI. Las células después de una preincubación durante un cierto período de tiempo (por ejemplo, 8 horas o 24 horas) se incuban con un compuesto de ensayo a concentraciones diluidas seriadamente (por ejemplo, cinco diluciones 1:10) durante 24 horas y/o 48 horas. y/o otro período de tiempo específico. La citotoxicidad dependiente de la dosis y/o los efectos citostáticos de los compuestos de ensayo se pueden someter a ensayo y evaluar utilizando el método de ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), como describen, por ejemplo, Boyd (In *Principle of Practice of Oncology*, Devita, J. T., Hellman, S. and Rosenberg S. A. (Eds), 1989, Vol, 3, PPO Update, No. 10).

Se puede utilizar otro análisis *in vitro* para evaluar el efecto de los compuestos en la detención de la progresión del ciclo celular. Más específicamente, se añade un compuesto de ensayo a las células de ciertas líneas celulares de una manera dependiente de la concentración. Después de incubar las células durante un período de tiempo

específico, las células se tiñen con yoduro de propidio y se utilizan para la evaluación de la citometría de flujo. Se determinan las poblaciones celulares de las fases sub-G0/G1, G0/G1, S y G2/M. Todos los análisis *in vitro* anteriores son análisis de punto final de punto temporal único (o puntos temporales múltiples que utilizan múltiples placas) basados en células.

5 Los compuestos de ensayo también se pueden analizar utilizando un nuevo sistema de análisis de escrutinio basado en células *in vitro* basado en la medición electrónica de las impedancias del sustrato celular o del electrodo celular. A diferencia de todos los sistemas de análisis de punto final, el sistema de análisis de escrutinio basado en células permite el seguimiento en tiempo real de la respuesta dinámica de las células cancerosas a agentes anticancerosos sin marcar las células. Este sistema también se puede utilizar para una gran escala de escrutinio de alto rendimiento basado en células *in vitro* de agentes anticancerosos. El enfoque se caracteriza por la integración de la biología molecular y celular con la microelectrónica y se basa en la detección electrónica del procedimiento de análisis biológico.

15 Los detalles de esta tecnología de detección electrónica de células, llamada detección electrónica de células en tiempo real (RT-CES™) y dispositivos, sistemas y métodos de uso asociados se describen en la solicitud provisional de los Estados Unidos número 60/397.749, presentada el 20 de julio de 2002; la solicitud provisional de los Estados Unidos Número 60/435.400, presentada el 20 de diciembre de 2002; la solicitud provisional de Estados Unidos número 60/469.572, presentada el 9 de mayo de 2003, la solicitud PCT número PCT/US03/22557, presentada el 18 de julio de 2003; la solicitud PCT número PCT/US03/22537, presentada el 18 de julio de 2003; la solicitud PCT número PCT/US04/37696, presentada el 12 de noviembre de 2004; la solicitud PCT número PCT/US05/04481, presentada el 9 de febrero de 2005; la solicitud de patente de los Estados Unidos número 10/705.447, presentada el 10 de noviembre de 2003; la solicitud de patente de los Estados Unidos número 10/705.615, presentada el 10 de noviembre de 2003; la solicitud de patente de los Estados Unidos número 10/987.732, presentada el 12 de noviembre de 2004; la solicitud de patente de los Estados Unidos número 11/055.639, presentada el 9 de febrero de 2005. Los detalles adicionales de la tecnología RT-CES se describen en la solicitud provisional de los Estados Unidos número 60/519.567, presentada el 12 de noviembre de 2003 y la solicitud provisional de los Estados Unidos número 60/542.927, presentada el 9 de febrero de 2004, la solicitud provisional de los Estados Unidos número 60/548.713, presentada el 27 de febrero de 2004, la solicitud provisional de los Estados Unidos número 60/598.608, presentada el 4 de agosto de 2004; la solicitud provisional de los Estados Unidos número 60/598.609, presentada el 4 de agosto de 2004; la solicitud provisional de los Estados Unidos número 60/613.749, presentada el 27 de septiembre de 2004; la solicitud provisional de los Estados Unidos número 60/613.872, presentada el 27 de septiembre de 2004; la solicitud provisional de los Estados Unidos número 60/614.601, presentada el 29 de septiembre de 2004; la solicitud provisional de los Estados Unidos número 60/630.071, presentada el 22 de noviembre de 2004; la solicitud provisional de los Estados Unidos número 60/630.131, presentada el 22 de noviembre de 2004.

Para medir la impedancia del sustrato celular o del electrodo de células utilizando la tecnología RT-CES, se fabrican microelectrodos con geometrías apropiadas en las superficies inferiores de la placa de microtitulación o dispositivo similar, orientadas hacia los pocillos. Las células se introducen en los pocillos de los dispositivos y hacen contacto y se unen a las superficies de los electrodos. La presencia, ausencia o cambio de propiedades de las células afecta al paso electrónico e iónico en las superficies del sensor del electrodo. La medición de la impedancia entre los electrodos proporciona información importante sobre el estado biológico de las células presentes en los sensores. Cuando hay cambios en el estado biológico de las células análogas, las señales electrónicas de lectura se miden automáticamente y en tiempo real, y se convierten en señales digitales para su procesamiento y análisis. En un sistema RT-CES, se obtiene automáticamente un índice celular y se proporciona en función de los valores medidos de impedancia del electrodo. El índice celular obtenido para un pocillo dado refleja: 1) cuántas células se fijan a las superficies de los electrodos en este pocillo; 2) cómo de bien se fijan las células a las superficies de los electrodos en este pocillo. Por lo tanto, cuantas más células del mismo tipo en condiciones fisiológicas similares se fijan a las superficies del electrodo, mayor será el índice celular. Y, cuanto mejor se fijan las células a las superficies del electrodo (p.ej., las células se extienden más para tener áreas de contacto más grandes, o las células se fijan más fuertemente a las superficies de los electrodos), mayor será el índice celular.

Mediante el uso del sistema RT-CES, se ha demostrado que el trisulfuro de dibencilo inhibe la proliferación de una variedad de tipos de cáncer. El trisulfuro de dibencilo no se ha encontrado previamente utilizando análisis de punto final convencionales. Los investigadores previos llegaron a la conclusión negativa de que el trisulfuro de dibencilo no tiene actividad antiproliferativa ("Discovery of novel inducers of cellular differentiation using HL-60 promyelocytic cells", Mata-Greenwood, E., Ito, A., Westernburg, H., Cui, B., Mehta, R. G., Kinghorn, A. D. and Pezzuto, J. M. Anticancer Res. 2001, 21, 1763-1770).

60 Para evaluar la eficacia anticancerosa y predecir posibles mecanismos de la acción anticancerosa del trisulfuro de dibencilo, se sometieron a ensayo diez compuestos anticancerosos con mecanismos de acción conocidos junto con trisulfuro de dibencilo utilizando un panel de 12 líneas celulares de cáncer. Los patrones de células sensibles, dependientes del tiempo de trisulfuro de dibencilo (a ciertas concentraciones) fueron algo similares a los de

paclitaxel, la vinblastina y la colcemida (a ciertas concentraciones). Por lo tanto, el trisulfuro de dibencilo puede tener mecanismos de acción anticancerosa similares a los del paclitaxel, la vinblastina y la colcemida. El trisulfuro de dibencilo puede actuar sobre las células cancerosas a través de otros mecanismos de acción, diferentes de los del paclitaxel, la vinblastina y la colcemida. También es posible que el trisulfuro de dibencilo actúe sobre las células cancerosas a través de múltiples mecanismos de acción, incluido el mecanismo de acción similar a los del paclitaxel, la vinblastina y la colcemida.

Además de los modelos celulares y formatos de análisis *in vitro*, la actividad antitumoral de los compuestos puede examinarse y evaluarse adicionalmente mediante *in vivo* modelos animales con cáncer trasplantado. La mayoría de los modelos *in vivo* son modelos de ratón.

Escrutinio basado en células *in vitro* utilizando el sistema de detección electrónica de células en tiempo real (RT-CES)

El sistema RT-CES comprende tres componentes, un analizador con sensor electrónico, una estación de dispositivo y dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X. El conjunto de sensores de microelectrodos se fabricó en portaobjetos de vidrio con métodos de microfabricación litográfica y los portaobjetos que contienen electrodos se ensamblan en bandejas de plástico para formar pocillos que contienen electrodos. Cada dispositivo de placa de microtitulación 16X (o 96X) utilizado en el sistema RT-CES comprende hasta 16 (o 96) de tales pocillos que contienen electrodos. La estación del dispositivo recibe los dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X y es capaz de conmutar electrónicamente cualquiera de los pocillos al analizador con sensor para la medición de la impedancia. En funcionamiento, los dispositivos con células cultivadas en los pocillos se colocan en una estación de dispositivo que se encuentra dentro de una incubadora. Los cables eléctricos conectan la estación del dispositivo al analizador con sensor. Bajo el control del soporte lógico RT-CES, el analizador con sensor puede seleccionar automáticamente los pocillos que se van a medir y realizar continuamente mediciones de impedancia. Los datos de impedancia del analizador se transfieren a una computadora, se analizan y se procesan mediante el soporte lógico integrado.

La impedancia medida entre los electrodos en un pocillo individual depende de la geometría del electrodo, de la concentración iónica en el pocillo y de si hay células fijadas a los electrodos. En ausencia de las células, la impedancia del electrodo se determina principalmente mediante el entorno iónico tanto en la interfase electrodo/solución como en la solución a granel. En presencia de las células, las células fijadas a las superficies del sensor del electrodo alterarán el entorno iónico local en la interfase electrodo/solución, lo que provocará un aumento de la impedancia. Cuantas más células haya sobre los electrodos, mayor será el aumento en la impedancia del electrodo de células. Además, el cambio de impedancia también depende de la morfología celular y del grado en que las células se adhieren a los electrodos.

Para cuantificar el estado de la célula en función de la impedancia medida del electrodo de células, se obtiene un parámetro denominado Índice Celular, de acuerdo con

$$IC = \max_{i=1, \dots, N} \left(\frac{R_{célula}(f_i)}{R_b(f_i)} - 1 \right)$$

dónde $R_b(f)$ y $R_{célula}(f)$ son las resistencias del electrodo dependientes de la frecuencia (un componente de la impedancia) sin células o con células presentes, respectivamente. N es el número de puntos de frecuencia en los que se mide la impedancia. Por lo tanto, el Índice Celular es una medida cuantitativa del estado de las células en un pocillo que contiene electrodos. Bajo las mismas condiciones fisiológicas, más células fijadas a los electrodos conducen a mayor valor $R_{célula}(f)$, lo que lleva a un mayor valor para el Índice Celular. Además, para el mismo número de células presentes en el pocillo, un cambio en el estado de la célula, tal como la morfología, dará lugar a un cambio en el Índice Celular. Por ejemplo, un aumento de la adherencia celular o extensión de las células conduce a un área de contacto mayor entre el electrodo y la célula lo cual conducirá a un aumento en $R_{célula}(f)$ y, por lo tanto, un mayor valor para el Índice Celular. El Índice Celular también puede calcularse utilizando una fórmula diferente a la que se describe en la presente memoria. Se pueden encontrar otros métodos para calcular el Índice Celular basado en la medición de impedancia en la solicitud PCT número PCT/US04/37696, presentada el 12 de noviembre de 2004, solicitud PCT número PCT/US05/04481, presentada el 9 de febrero de 2005, la solicitud de patente de los Estados Unidos número 10/987.732, presentada el 12 de noviembre de 2004 y la solicitud de patente de los Estados Unidos número 11/055.639, presentada el 9 de febrero de 2005.

Se sembraron diferentes tipos de células cancerosas humanas, incluyendo NCI-H460 (células de cáncer de pulmón de células no pequeñas), MV522 SW (células de cáncer de pulmón de células no pequeñas), MCF7 (células de cáncer de mama), A549 (células de cáncer de pulmón de células no pequeñas), PC3 (células de cáncer de próstata), A431 (células de cáncer epidermoide), HT1080 (células de fibrosarcoma), MDA.MB2321 (células de

cáncer de mama), HT29 (células de cáncer de colon), HCC2998 (células de cáncer de colon), OVCAR4 (células de cáncer de ovario), A2780 (células de cáncer de ovario) y HepG2 (hepatosarcoma humano) en diferentes cantidades (4000 a 20.000 por pocillo) en un dispositivo de microtitulación 16X o 96X y se controlaron mediante el sistema RT-CES™. Las células se dejaron crecer durante aproximadamente 24 horas antes de la adición de trisulfuro de dibencilo disuelto en solución de DMSO (concentración final de DMSO: 0,2%, concentración final de trisulfuro de dibencilo: entre 1,5625 μM y 100 μM). La impedancia del electrodo de células se midió continuamente y se obtuvieron y registraron los correspondientes valores del índice celular dependientes del tiempo.

Las Figuras 1-5, 6A y 7-12 muestran el índice de células dependientes del tiempo para varias líneas celulares antes y después de la adición de trisulfuro de dibencilo (que no forma parte de la invención) a diversas concentraciones. Como se muestra en las Figuras, el trisulfuro de dibencilo exhibió un efecto inhibitorio sobre la proliferación de diversas líneas celulares cancerosas. La susceptibilidad al trisulfuro de dibencilo difiere entre los tipos de células cancerosas. Para algunos tipos de células cancerosas, una dosis baja de trisulfuro de dibencilo es suficiente para inhibir significativamente la proliferación de células cancerosas, mientras que para otros tipos de células cancerosas, se necesita una dosificación más alta para lograr un grado de inhibición similar.

En un ejemplo, las Figuras 1B y 1C muestran el índice celular dependiente del tiempo para células H460 (línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas) antes y después de la adición de colcemida y paclitaxel a diversas concentraciones. Como se muestra en las Figuras 1B y 1C, la colcemida y el paclitaxel exhibieron una capacidad inhibitoria frente a la proliferación de células A431 a las concentraciones estudiadas. Además, estas figuras indican que después de la adición del compuesto (colcemida o paclitaxel), los índices celulares para las células H460 disminuyeron primero con el tiempo y a continuación aumentaron, mostrando que las células H460 tenían respuestas cinéticas complejas a la colcemida y al paclitaxel. Es digno de mención que las curvas de índice celular mostradas en la Figura 1A para las células H460 bajo la influencia del trisulfuro de dibencilo (DBTS) a una concentración de 25 μM y superior son algo similares a las curvas en las Figuras 1B y 1C, es decir, después de la adición de DBTS (25 μM y superior), los índices celulares para células H460 también disminuyeron primero con el tiempo y a continuación aumentaron.

En otro ejemplo, la Figura 6B muestra el índice celular dependiente del tiempo para las células A431 (línea celular de cáncer epidermoide) antes y después de la adición de 5-fluorouracilo (que no forma parte de la invención) a diversas concentraciones. Como se muestra en la Figura 6B, el 5-fluorouracilo exhibió una capacidad inhibitoria frente a la proliferación de células A431 a concentraciones 12,5 μM y superiores. Las curvas del índice celular dependientes del tiempo en la Figura 6B son significativamente diferentes de las de la Figura 6A.

En otro ejemplo, la Figura 13 muestra los datos del índice celular de las líneas celulares HepaG-2 bajo la influencia del trisulfuro de dibencilo. Como se muestra en la Figura 13, el trisulfuro de dibencilo no demostró capacidad antiproliferación en células HepaG-2.

Escrutinio *in vivo* de la actividad anticancerosa

Para evaluar la eficacia anticancerosa *in vivo* de los compuestos de ensayo incluyendo DBTS y ACEA100108 (un derivado de DBTS, véase la Tabla 33), se utilizaron varios modelos de ratón, incluyendo el modelo S180 de sarcoma de ratón, el modelo de cáncer de pulmón Lewis de ratón, el modelo de leucemia linfocítica P388 y tres modelos de xenoinjerto de tumores humanos en ratones atímicos inmunodeficientes: cáncer de mama humano Bcap-37, cáncer de colon humano HCT-8, cáncer de ovario humano ao12/17. Detalles de la eficacia anticancerosa *in vivo* de los compuestos de ensayo se proporciona a continuación.

Evaluación de la toxicidad aguda de DBTS y del compuesto ACEA100108

Para evaluar la toxicidad intravenosa aguda *in vivo* de DBTS y ACEA100108 (un derivado de DBTS, véase la Tabla 33), los experimentos se realizaron en ratones Kunming normales que no portan tumores mediante el control de la respuesta aguda de ratones a una dosis única de DBTS o ACEA100108 *vía* inyección intravenosa (i.v.). El número de muertes para los ratones tratados se controló y registró. Se calcularon los valores de DL₅₀ de estos compuestos. Los detalles del estudio se proporcionan a continuación.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar pero no para limitar la invención.

Ejemplo 1 (No forma parte de la invención)

Actividad anticancerosa de DBTS contra el sarcoma de ratón S180 y el cáncer de pulmón de Lewis en ratón

Para evaluar la eficacia anticancerosa *in vivo* de los compuestos de ensayo, se utilizaron dos modelos de tumor trasplantado de ratón para la evaluación *in vivo*: el modelo S180 de sarcoma de ratón y el modelo de cáncer de pulmón de Lewis de ratón. Los ratones experimentales se mantuvieron en el Laboratorio de Farmacología del

Instituto de Industria Farmacéutica de Shanghai. La fuente y las especificaciones del ratón son las siguientes. Los ratones eran cepas C57BL/6 y Kunming, proporcionados por Academic Sinica, Experimental Animal Center, y número de certificación: Academic Sinica Experimental Animal Certificate, Núm. 5. El peso del ratón está entre 18-20 g. Se utilizaron ratones macho y hembra. Sin embargo, para cada experimento, se utilizaron animales del mismo sexo. El número de animales sometidos a ensayo fue el siguiente: 30 ratones para el grupo de compuesto de ensayo, incluyendo 10 para el grupo de dosis alta, 10 para el grupo de dosis media y 10 para el grupo de dosis baja; 10 ratones fueron para el grupo compuesto positivo; 20 ratones para el grupo de control negativo, incluyendo 10 ratones para el grupo de Solución Salina Normal y 10 ratones para el grupo que solo había recibido disolvente. Las dosis alta, media y baja de DBTS son, 50, 25 y 12,5 mg/kg/d, respectivamente.

Controles de ensayo Para el control negativo, se establecieron dos grupos: el grupo de control solo con disolvente y el grupo control con solución salina normal. En el grupo de control solo con disolvente, a cada ratón se le administró por vía intravenosa el disolvente solo con el mismo volumen y la misma concentración (10% para el modelo S180 de sarcoma y 5% para el modelo de cáncer de pulmón de Lewis) que las utilizadas para el ensayo con DBTS a dosis alta. una vez al día, y durante 7 o 10 días consecutivos. En el grupo de solución salina normal, a cada ratón se le administraron 0,5 mL de solución salina normal, una vez al día y durante 7 o 10 días consecutivos. Para el grupo de control positivo, el compuesto anticanceroso, ciclofosfamida (CTX) se administró por vía intraperitoneal a 30 mg/kg, una vez al día y durante 7 o 10 días consecutivos.

Preparación y administración de compuestos de ensayo. Las soluciones de compuestos de ensayo para evaluar modelos de cáncer de eficacia antitumoral se prepararon de la siguiente manera. En el modelo de ratón S180 de sarcoma de ratón, se disolvieron 200 mg de DBTS en 10 mL de aceite de ricino (en versión polioxietilada) primero, y a continuación se mezclaron con 90 mL de solución salina normal. La concentración final de DBTS en la solución es de 0,2%, y la concentración final del disolvente es de 10%. A cada ratón se le administró por vía intravenosa la solución de compuesto de 0,5 mL (dosis alta), 0,3 mL (dosis media) y 0,15 mL (dosis baja), respectivamente.

En el modelo de cáncer de pulmón de Lewis de ratón, se disolvieron 200 mg de DBTS en 5 mL de aceite de ricino (en versión polioxietilada). Cada vez antes de su uso, esta solución se diluyó con solución salina normal para lograr una concentración final de DBTS de 0,2% (dosis alta), 0,1% (dosis media) y 0,05% (dosis baja) respectivamente. En este caso, a cada ratón (aproximadamente 20 g de peso) se le administraron por vía intravenosa 0,5 mL de la solución de compuesto de una concentración de compuesto determinada. La velocidad de inyección intravenosa fue de aproximadamente 0,5 mL/0,5 min.

Las dosificaciones y la administración de los compuestos de ensayo están dentro del conocimiento de los expertos en farmacología. Por ejemplo, los compuestos de ensayo pueden administrarse mediante inyección intravenosa con una solución de compuesto de ensayo dos veces al día y durante 7 días consecutivos. Alternativamente, los compuestos de ensayo se pueden administrar mediante inyección intravenosa con una solución de compuesto de ensayo una vez al día y durante 10 días consecutivos.

Preparación de células tumorales para su trasplante y determinación de la eficacia del compuesto. Para preparar las células tumorales, los tumores de crecimiento rápido se eliminaron primero de los ratones con tumores trasplantados (el modelo S180 de sarcoma o el modelo de cáncer de pulmón de Lewis), se diseccionaron los tejidos tumorales y se prepararon las suspensiones de células tumorales a partir de los tejidos diseccionados a la concentración de $2-4 \times 10^7$ células tumorales/ml. Se trasplantaron 0,2 mL de la suspensión de células tumorales (entre 4 y 8 millones de células tumorales) de nuevo a un ratón experimental mediante inyección subcutánea. Veinticuatro horas después del trasplante, a los ratones se les administró por vía intravenosa una dosis determinada de DBTS, con solución salina normal, o solo disolvente que sirvió como control negativo, o con 50 mg/kg de CTX por vía intraperitoneal que sirvió como control positivo. Dos semanas después del trasplante, los ratones se sacrificaron y los tumores trasplantados se retiraron de los ratones experimentales. Cada tumor sólido retirado se ponderó, y se calculó la tasa de inhibición tumoral en los grupos tratados con DBTS y en el grupo tratado con CTX de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Tasa de inhibición tumoral \%} = \frac{(\text{peso medio del tumor en el grupo de control negativo} - \text{peso medio del tumor en el grupo tratado con el compuesto})}{\text{peso medio del tumor en el grupo de control negativo}} \times 100 \quad (2)$$

Para el modelo S180 de sarcoma de ratón, las células S180 se trasplantaron por vía subcutánea a aproximadamente 5 millones de células por ratón. Después de 24 horas del trasplante, a cada ratón del grupo de ensayo se le administró por vía intravenosa trisulfuro de dibencilo a 50, 25 o 12,5 mg/kg, respectivamente, por día y durante 7 o 10 días consecutivos. Para el grupo de control positivo, a cada ratón se le administró ciclofosfamida (Cytosan, CTX) a 50 mg/kg por vía intraperitoneal por día y durante 7 días consecutivos. Para el grupo de control negativo, a cada ratón se le administró por vía intravenosa solución salina normal o el disolvente para trisulfuro de dibencilo a la misma concentración que en el grupo de ensayo por día y durante 7 días consecutivos. Para cada grupo, se utilizaron 10 ratones.

Para el modelo de cáncer de pulmón Lewis de ratón, las células de cáncer de pulmón de Lewis se trasplantaron por vía subcutánea a aproximadamente 5 millones de células por ratón. Después de 24 horas del trasplante, a cada ratón del grupo de ensayo se le administró por vía intravenosa trisulfuro de dibencilo a 50, 25 o 12,5 mg/kg por día y durante 10 días consecutivos. Para el grupo de control positivo, a cada ratón se le administró CTX a 50 mg/kg por vía intraperitoneal por día y durante 10 días consecutivos. Para el grupo de control negativo, a cada ratón se le administró por vía intravenosa solución salina normal o el disolvente para trisulfuro de dibencilo a la misma concentración que en el grupo de ensayo por día y durante 10 días consecutivos. Para cada grupo, se utilizaron 10 ratones.

Resultados. En el modelo S180 de sarcoma de ratón, el DBTS mostró una tasa de inhibición tumoral promedio de 63,30%, 54,68% y 48,69% para los grupos de dosificación de 50, 25 y 12.5 mg/kg respectivamente (con respecto al control de solución salina normal). Los resultados detallados se muestran en la Tabla 9 y la Figura 14, que describen un estudio de eficacia *in vivo* de DBTS al 0,2% en el modelo S180 de sarcoma de ratón. En la Figura 14, las siete filas (1-7, respectivamente) representan los resultados de los siguientes compuestos administrados (iv x 7qd): 1) control negativo; 2) solución salina normal; 3) DBTS (25 mL/kg); 4) DBTS (15 mL/kg); 5) DBTS (7,5 mL/kg); 6) control de disolvente (15 mL/kg) y 7) control positivo CTX (30 mg/kg).

Se observó que inmediatamente después de la inyección intravenosa de DBTS, los ratones exhibieron reacciones anormales transitorias que incluyeron saltos, respiración rápida y acción de recostarse seguido de reducción de actividades. Tales reacciones típicamente duraban de 10 a 15 minutos. Las mismas reacciones anormales también se observaron en los ratones a los que se había inyectado por vía intravenosa solo disolvente. Por lo tanto, la velocidad de inyección y la alta concentración del disolvente que no sea DBTS pueden dar como resultado reacciones transitorias anormales en los ratones.

En el modelo de cáncer de pulmón Lewis, el DBTS mostró una tasa de inhibición tumoral promedio de 67,05%, 51,34% y 45,21% para los grupos de dosificación de 50, 25 y 12,5 mg/kg respectivamente (en relación con el control de solución salina normal). Los resultados detallados se resumen en la Tabla 10 y la Figura 15, que describen un estudio de eficacia de DBTS al 0,2% en cáncer de pulmón de Lewis en ratón. En la Figura 15, las siete filas (1-7, respectivamente) representan los resultados de los siguientes compuestos administrados: 1) control negativo; 2) solución salina normal; 3) DBTS (25 mL/kg); 4) DBTS (15 mL/kg); 5) DBTS (7,5 mL/kg); 6) control de disolvente (15 mL/kg) y 7) CTX de control positivo (30 mg/kg). El DBTS y el control del disolvente se administraron iv x 10 qd; el control positivo se administró ip x 7qd. En contraste con los ratones utilizados para el experimento S180 de sarcoma de ratón, los ratones a los que se había inyectado por vía intravenosa DBTS o disolvente en este experimento mostraron reacciones transitorias anormales mínimas.

Al utilizar el disolvente solo como control negativo, las tasas de inhibición tumoral *in vivo* promedio de DTBS para el sarcoma S180 son 50,25%, 38,58% y 30,46% en 50, 25 y 12,5 mg/kg de grupos de dosificación respectivamente, como se muestra en la Tabla 11. Para el modelo de cáncer de pulmón Lewis, las tasas de inhibición tumoral *in vivo* promedio de DTBS son 62,28%, 44,30% y 37,38% en los grupos de dosificación de 50, 25 y 12,5 mg/kg respectivamente, como se muestra en la Tabla 12.

Los resultados generados a partir de dos modelos tumorales trasplantados de ratón demuestran la inhibición específica del crecimiento del tumor trasplantado a los ratones a los que se había administrado por vía intravenosa DBTS. Cuando se administró por vía intravenosa una dosis alta de DBTS (50 mg/kg/d, y durante 7 o 10 días consecutivos), se logró una tasa de inhibición tumoral de 65% en cualquier modelo de tumor trasplantado de ratón, utilizando la solución salina normal como control negativo. El disolvente utilizado para preparar la solución de DBTS mostró un efecto inhibitor débil sobre el crecimiento tumoral en los modelos de tumor trasplantado de ratón, y también puede causar reacciones anormales transitorias en ratones después de la inyección intravenosa.

Tabla 9.

Eficacia antitumoral <i>in vivo</i> de DBTS en el modelo S180 de sarcoma de ratón (sarcoma trasplantado subcutáneamente)						
Muestra	Dosificación (mg/kg/d)	Método de administración	Número de animal (comienzo/final)	Peso del animal (g) comienzo/final	Peso del tumor (g) X +/- SD	Tasa de inhibición (%)
DBTS	50	iv X 7 qd	10/10	19,5/22,9	0.98±0.20†	63.30
DBTS	25	iv X 7 qd	10/10	19,4/23,8	1.21±0.14†	54.68
DBTS	12.5	iv X 7 qd	10/10	19,4/24,5	1.37±0.12†	48.69
Control positivo	30	ip X 7 qd	10/10	19,6/20,3	0.22±0.11†	91.76

Eficacia antitumoral <i>in vivo</i> de DBTS en el modelo S180 de sarcoma de ratón (sarcoma trasplantado subcutáneamente)						
Muestra	Dosificación (mg/kg/d)	Método de administración	Número de animal (comienzo/final)	Peso del animal (g) comienzo/final	Peso del tumor (g) X +/- SD	Tasa de inhibición (%)
(CTX)						
Control negativo	Solución salina normal	iv X 7 qd	10/10	19,3/24,8	2.67±0.15	

‡: p <0,01, en comparación con el control negativo.

Tabla 10.

Eficacia antitumoral <i>in vivo</i> de DBTS en el modelo de cáncer de Lewis en ratones (tumor trasplantado subcutáneamente)						
Muestra	Dosificación (mg/kg/d)	Método de administración	Número de animal (comienzo/final)	Peso del animal (g) comienzo/final	Peso del tumor (g) X +/- SD	Tasa de inhibición (%)
DBTS	50	iv X 10 dd	10/10	18,9/22,9	0,86±0,14‡	67,05
DBTS	25	iv X 10 dd	10/10	19,3/23,5	1,27±0,22‡	51,34
DBTS	12,5	iv X 10 dd	10/10	19,0/23,9	1,43±0,18‡	45,21
Control positivo (CTX)	30	ip X 10 qd	10/10	19,1/20,2	0,323±0,14‡	87,62
Control negativo	Solución salina normal	iv X 10 dd	20/20	19,2/24,9	2,61±0,25	

‡: p <0,01, en comparación con el control negativo.

Tabla 11.

Eficacia antitumoral <i>in vivo</i> de DBTS en el modelo S180 de sarcoma de ratón (tumor trasplantado subcutáneamente)						
Muestra	Dosificación (mg/kg/d)	Método de administración	Número de animal (comienzo/final)	Peso del animal (g) comienzo/final	Peso del tumor (g) X +/- SD	Tasa de inhibición (%)
DBTS	50	iv X 7 qd	10/10	19,5/22,9	0,98±0,20‡	50,25
DBTS	25	iv X 7 qd	10/10	19,4/23,8	1,21±0,14‡	38,58
DBTS	12,5	iv X 7qd	10/10	19,4/24,5	1,37±0,12‡	30,46
Control positivo (CTX)	30	ip X 7qd	10/10	19,6/20,3	0,22±0,11‡	88,83
Control negativo	10% disolvente	iv X 7qd	10/10	19,3/24,7	1,97±0,18	

‡: p <0,01, en comparación con el control negativo solo con disolvente (10%).

5

Tabla 12.

Eficacia antitumoral <i>in vivo</i> de DBTS en el modelo de cáncer de Lewis en ratones (tumor trasplantado subcutáneamente)						
Muestra	Dosificación (mg/kg/d)	Método de administración	Número de animal (comienzo/final)	Peso del animal (g) comienzo/final	Peso del tumor (g) X +/- SD	Tasa de inhibición (%)

Eficacia antitumoral *in vivo* de DBTS en el modelo de cáncer de Lewis en ratones (tumor trasplantado subcutáneamente)

Muestra	Dosificación (mg/kg/d)	Método de administración	Número de animal (comienzo/final)	Peso del animal (g) comienzo/final	Peso del tumor (g) X +/- SD	Tasa de inhibición (%)
DBTS	50	iv X 10 dd	10/10	18,9/22,9	0,86±0,14†	62,28
DBTS	25	iv X 10 dd	10/10	19,3/23,5	1,27±0,22†	44,30
DBTS	12,5	iv X 10 dd	10/10	19,0/23,9	1,43±0,18†	37,28
Control positivo (CTX)	30	ip X 7 qd	10/10	19,1/20,2	0,323±0,14†	85,83
Control negativo	5% disolventes	iv X 7 qd	20/20	19,1/24,3	2,28±0,25	

†: p <0.01, en comparación con el control negativo solo con disolvente al 5%.

Ejemplo 2 (No forma parte de la invención)**Actividad anticancerosa de DBTS en cáncer de pulmón de Lewis de ratón**

5 Este estudio evalúa la eficacia anticancerosa *in vivo* del trisulfuro de dibencilo (DBTS) en el modelo de cáncer de pulmón Lewis de ratón como en el Ejemplo 1. Los ratones experimentales se mantuvieron en el Laboratorio de Farmacología del Instituto de Industria Farmacéutica de Shanghai. Los ratones para los experimentos fueron de la cepa C₅₇BL/6, proporcionada por Academic Sinica, Experimental Animal Center, número de certificación: SCXK (Shanghai) 2003-0003. El peso del ratón estaba entre 18 y 20 g. Solo se utilizaron ratones hembra. El número de animales evaluados fue el siguiente: 10 para cada grupo de dosis, 10 para el grupo de control positivo y 20 para el grupo de control negativo (10 para el grupo de control fisiológico y 10 para el grupo de control de disolvente).

15 Control de ensayo. Para el control negativo, se establecieron dos grupos: el grupo de control solo con disolvente y el grupo de control con solución salina normal. En el grupo de control solo con disolvente, a cada ratón se le administró por vía intravenosa el disolvente que tenía solo el mismo volumen y la misma concentración (5% de disolvente en solución salina normal) que los utilizados en un ensayo con DBTS a dosis alta, una vez al día, durante 7-10 consecutivos días. En el grupo de solución salina normal, a cada ratón se le administraron 0,5 mL de solución salina normal, una vez al día, durante 10 días consecutivos. Para el grupo control positivo, se administró un compuesto anticanceroso, ciclofosfamida (Cytosan, CTX, para uso intraperitoneal) por vía intraperitoneal a 30 mg/kg, una vez al día durante 7 días consecutivos. Además, como grupo de referencia, se administró un compuesto anticanceroso, Taxol, por vía intravenosa a 15, 10 y 7,5 mg/kg, una vez al día durante 5 días consecutivos.

25 Preparación y administración de compuestos de ensayo. Se disolvieron 400 mg de DBTS en 10 mL de aceite de ricino (disolvente) para tener una concentración de DBTS de 40 mg/ml en el disolvente. Cada vez antes de su uso, esta solución se diluyó en solución salina normal para lograr las concentraciones deseadas de DBTS. Se añadió solución salina normal para diluir la solución de DBTS a las concentraciones deseadas de 0,2% (dosis alta), 0,1% (dosis media) y 0,05% (dosis baja) respectivamente. A cada ratón se le administró por vía intravenosa la solución del compuesto de 0,5 mL a una velocidad de inyección controlada de 0,5 mL/0,5 min. Veinticuatro horas después del trasplante tumoral, las inyecciones intravenosas de soluciones de compuestos en ratones portadores se realizaron una vez al día, durante 7 o 10 días consecutivos.

35 Preparación de células tumorales para el trasplante y determinación de la eficacia del compuesto. Para preparar las células tumorales, los tumores de crecimiento rápido se retiraron primero de los ratones con tumores trasplantados, los tejidos tumorales se disecaron y las suspensiones de células tumorales se prepararon en solución salina normal para tener una concentración de 2-4 x 10⁷ células/ml. Se inyectaron por vía subcutánea 0,2 mL de suspensión celular en la región axilar de cada ratón. Veinticuatro horas después del trasplante, a los ratones se les administró una dosis determinada de DBTS, con solución salina normal, o solo disolvente que sirve como control negativo, o con 30 mg/kg de CTX por vía intraperitoneal que sirvió como control positivo. Aproximadamente dos semanas después del trasplante, los ratones se sacrificaron y los tumores trasplantados se eliminaron de los ratones experimentales. Cada tumor sólido retirado se pesó; la tasa de inhibición tumoral en cada grupo de dosificación se calculó de acuerdo con la ecuación (2) del Ejemplo 1 (Actividad anticancerosa de DBTS contra sarcoma de ratón S180 y cáncer de pulmón de Lewis de ratón).

45 Para el modelo de cáncer de pulmón de Lewis de ratón, las células de cáncer de pulmón de Lewis se trasplantaron

por vía subcutánea a aproximadamente 6 millones de células por ratón. Después de 24 horas del trasplante, a cada ratón del grupo de ensayo se le administró por vía intravenosa trisulfuro de dibencilo a 50, 25 o 12,5 mg/kg por día y durante 10 días consecutivos. Para el grupo de control positivo, a cada ratón se le administró CTX a 30 mg/kg por vía intraperitoneal por día y durante 7 días consecutivos. Para el grupo de control negativo, a cada ratón se le administró por vía intravenosa solución salina normal o el disolvente para trisulfuro de dibencilo a la misma concentración que en el grupo de ensayo por día y durante 10 o 7 días consecutivos. Para cada grupo, se utilizaron 10 ratones. Para el grupo de referencia con Taxol, a cada ratón del grupo de ensayo se le administró por vía intravenosa Taxol a 15, 10 o 7,5 mg/kg por día y durante 5 días consecutivos.

Resultados. En el modelo de cáncer de pulmón de Lewis, el DBTS mostró una tasa de inhibición tumoral promedio de 65,77%, 51,61% y 43,10% para los grupos de dosificación de 50, 25 y 12,5 mg/kg respectivamente (con respecto al control de solución salina normal). Los resultados detallados se muestran en la Tabla 13. Al utilizar el disolvente solo como control negativo, las tasas de inhibición tumoral correspondientes son 61,02%, 46,94% y 35,10%, respectivamente (Tabla 14). Se observó que inmediatamente después de la inyección intravenosa de DBTS, los ratones exhibieron reacciones anormales transitorias que incluyeron saltos, respiración rápida y acción de recostarse seguido de reducción de actividades. Tales reacciones típicamente duraban de 10 a 15 minutos. Las mismas reacciones anormales también se observaron en los ratones a los que se había inyectado por vía intravenosa solo disolvente.

En el ensayo de referencia, el Taxol mostró una tasa de inhibición tumoral promedio de 48,94%, 36,97 y 30,28% para los grupos de dosificación de 15, 10 y 7,5 mg/kg respectivamente (con respecto al control de solución salina normal). Los resultados detallados se muestran en la Tabla 15.

El resultado generado en el modelo de cáncer de pulmón de Lewis de ratón demuestra la inhibición específica del crecimiento del tumor trasplantado en los ratones a los que se había administrado por vía intravenosa DBTS. Cuando se administró por vía intravenosa una dosis alta de DBTS (50 mg/kg/día, y durante 10 días consecutivos), se logró una tasa de inhibición tumoral del 65% en el modelo de tumor trasplantado de ratón, utilizando la solución salina normal como control negativo. Se ha demostrado que tales datos son reproducibles. El disolvente utilizado para preparar la solución de DBTS mostró un efecto inhibidor débil sobre el crecimiento tumoral en los modelos de tumor trasplantado de ratón, y también puede causar reacciones anormales transitorias en ratones después de la inyección intravenosa.

Tabla 13.

Eficacia antitumoral *in vivo* de DBTS en el modelo de cáncer de Lewis de ratón (tumor trasplantado subcutáneamente).

Muestra	Dosificación (mg/kg/d)	Método de administración	Núm. de animales comienzo/final	Peso del animal (g) comienzo/final	Peso del tumor (g) X ± DT	Tasa de inhibición tumoral (%)
DBTS	50	iv × 10qd	10/10	21,0/23,4	0,955±0,20***	65,77
DBTS	25	iv × 10qd	10/10	21,2/23,7	1,35±0,10***	51,61
DBTS	12.5	iv × 10qd	10/10	20,9/24,1	1,59±0,16***	43,01
Control positivo (CTX)	30	ip × 7qd	10/10	21,1/22,3	0,258±0,09***	90,75
Control negativo	Solución salina normal	iv × 10qd	20/20	21,3/26,0	2,79±0,30	

*** P <0,01, en comparación con el control negativo.

Tabla 14.

Eficacia antitumoral *in vivo* de DBTS en el modelo de cáncer de Lewis de ratón (tumor trasplantado subcutáneamente).

Muestra	Dosis mg/kg/d	Método de administración	Número de animal comienzo/final	Peso del animal (g) comienzo/final	Peso del tumor (g) X ± DT	Tasa de inhibición tumoral %
DBTS	50	iv × 10qd	10/10	21,0/23,4	0,955±0,20***	61,02
DBTS	25	iv × 10qd	10/10	21,2/23,7	1,35±0,10***	46,94

Eficacia antitumoral *in vivo* de DBTS en el modelo de cáncer de Lewis de ratón (tumor trasplantado subcutáneamente).

Muestra	Dosis mg/kg/d	Método de administración	Número de animal comienzo/final	Peso del animal (g) comienzo/final	Peso del tumor (g) X ± DT	Tasa de inhibición tumoral %
DBTS	12,5	iv × 10qd	10/10	20,9/24,1	1,59±0,16***	35,10
Control negativo	5% disolvente	iv × 7qd	10/10	21,3/26,0	2,79±0,30	

*** P <0,01, en comparación con el control negativo solo con disolvente al 5%.

Tabla 15.

Eficacia antitumoral *in vivo* de Taxol en el modelo de cáncer de Lewis de ratón (tumor trasplantado subcutáneamente). Los datos se utilizan aquí como referencia.

Muestra	Dosificación (mg/kg/d)	Método de administración	Número de animal comenzando/finalizando	Peso del animal (g) comienzo/final	Peso del tumor (g) X ± SOD	Tasa de inhibición tumoral %
Taxol	15	iv × 5qd	8/8	18,9/19,3	1,45±0,14***	48,94
Taxol	10	iv × 5qd	8/8	18,7/21,7	1,79±0,09***	36,97
Taxol	7,5	iv × 5qd	8/8	18,5/22,9	1,98±0,14***	30,28
Control negativo	Solución salina normal	iv × 5qd	16/16	18,6/24,9	2,84±0,31	

*** P <0,01, en comparación con el control negativo

Nota: El Taxol se utiliza a menudo como control positivo para el ensayo de eficacia anticancerosa. La dosificación es 10 mg/kg/d, iv x 7qd.

Ejemplo 3

5 **Actividad anticancerosa *in vivo* de ACEA100108 en cáncer de pulmón de Lewis y leucemia linfocítica P388 en ratones, y en cáncer de mama humano Bcap-37 y cáncer de colon humano HCT-8 en ratones atímicos**

10 Para evaluar la eficacia anticancerosa *in vivo* del compuesto ACEA100108 (derivado de DBTS, véase Tabla 33), se utilizaron modelos de ratón con cáncer trasplantado, incluyendo modelo de cáncer de pulmón de Lewis y modelo de leucemia linfocítica P388 y dos modelos de xenoinjerto de tumor humano en ratones atímicos inmunodeficientes: cáncer de mama humano Bcap-37 y cáncer de colon humano HCT-8. Todos los modelos de ratón se mantienen en el Laboratorio de Farmacología del Instituto de Industria Farmacéutica de Shanghai. Para los modelos de xenoinjerto de tumor humano, las células cancerosas se pasaron dos veces *in vivo* antes de ser trasplantado a los ratones atímicos para el estudio. Las células de cáncer humano cultivadas en un matraz se trasplantaron primero con xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes. Después de que las células cancerosas crecieron hasta un tumor de ciertos tamaños en los ratones atímicos, el tumor se retiró de los ratones atímicos y se diseccionaron los tejidos tumorales. Las suspensiones celulares se prepararon a partir del tejido tumoral disecado y se trasplantaron nuevamente a ratones atímicos inmunodeficientes (*es decir* el segundo pase de las células cancerosas en el modelo trasplantado de xenoinjerto de cáncer humano). Después de que las células cancerosas crecieron hasta cierto tamaño, el tumor se retiró de los ratones atímicos y los tejidos del tumor se disecaron. Las suspensiones celulares se prepararon a partir de tejidos diseccionados y se utilizaron para el estudio de modelos de xenoinjerto de cáncer humano descritos aquí.

25 Los ratones para experimentos fueron cepas de ratones atímicos C₅₇BL/6, DBF1 y BALB/c, proporcionadas por Academic Sinica, Experimental Animal Center, número de certificación: SCXK (Shanghai) 2003-0003. El peso del ratón estaba entre 18 y 22 g. Se utilizaron ratones macho y hembra. Sin embargo, para cada experimento, se utilizaron animales del mismo sexo. Para el modelo de tumor trasplantado de ratón, el número de animales sometidos a ensayo fue el siguiente: 10 para cada grupo de dosis, 10 para el grupo de control positivo y 20 para el grupo de control negativo. Para el modelo de xenoinjerto de tumor humano, el número de animales sometidos a ensayo fue el siguiente: 6 para cada grupo de dosis, 6 para el grupo de control positivo y 12 para el grupo de control negativo.

Control de ensayo. Para el control negativo, a cada ratón se le administró por vía intravenosa el disolvente que solo

tenía el mismo volumen y la misma concentración que los utilizados en el ensayo con dosis alta de ACEA100108, una vez al día, durante 7 días consecutivos. Para el grupo de control positivo, un compuesto anticanceroso, se administró Taxol por vía intravenosa a 10 mg/kg, una vez al día durante 7 días consecutivos. En un grupo de referencia, se administró DBTS por vía intravenosa a 50 mg/kg, una vez al día durante 7 días consecutivos.

Preparación y administración de compuestos de ensayo. El compuesto ACEA100108 se disolvió en aceite de ricino hidrogenado (disolvente) para tener una concentración de compuesto ACEA100108 de 20 mg/ml en el disolvente. Cada vez antes de su uso, esta solución se diluyó en solución salina normal para lograr las concentraciones deseadas de ACEA100108. A cada ratón (aproximadamente 20 g de peso) se le administró por vía intravenosa la solución del compuesto de 0,5 mL a una velocidad de inyección controlada de 0,5 mL/0,5 min. Veinticuatro horas después del trasplante tumoral, se realizaron las inyecciones intravenosas de soluciones de compuestos en ratones portadores una vez al día, durante 7 o 10 días consecutivos. Se utilizaron diferentes dosis del compuesto ACEA100108 entre 100 y 6,25 mg/kg en el estudio.

Preparación de células tumorales para el trasplante y determinación de la eficacia del compuesto. Para preparar las células cancerosas para el modelo de cáncer de pulmón de Lewis de ratón, el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano y el modelo de xenoinjerto de cáncer de colon humano, los tumores de crecimiento rápido se retiraron primero de los ratones con tumores trasplantados. Los tejidos tumorales se disecaron y las suspensiones de células tumorales se prepararon en solución salina normal para tener una concentración de $2-4 \times 10^7$ células/ml. Se inyectaron por vía subcutánea 0,2 mL de suspensión celular a la región axilar (lado derecho) de cada ratón. Veinticuatro horas después del trasplante, a los ratones se les administró una dosis determinada de ACEA100108, o solo disolvente que sirve como control negativo, o con 10 mg/kg de Taxol que sirvió como control positivo, o con 50 mg/kg de DBTS que sirvió como ensayo de referencia. Entre dos y cuatro semanas después del trasplante, los ratones se sacrificaron y los tumores trasplantados se retiraron de los ratones experimentales. Cada tumor sólido eliminado se pesó; la tasa de inhibición tumoral en cada grupo de dosificación se calculó de acuerdo con la ecuación (2) en el Ejemplo 1.

Para el modelo de xenoinjerto de tumor humano, todos los materiales utilizados, incluyendo alimentos para animales, jaulas de animales, materiales de soporte y aparatos que se ponen en contacto con los animales, se esterilizaron a alta presión. Los ratones atómicos se mantuvieron en estantes de flujo laminar en condiciones de SPF. Después del trasplante del tumor, el peso del ratón y el tamaño del tumor en cada grupo de dosificación del compuesto se controlaron dinámicamente y se trazaron. El tamaño del tumor se determinó midiendo el eje principal (a) y el eje secundario (b) del tumor, y el volumen del tumor se calculó de acuerdo con la fórmula

$$\text{Volumen tumoral} = a \times b^2/2 \quad (3)$$

Para preparar células cancerosas para el modelo de leucemia linfocítica murina P388, la ascitis de un ratón portador de leucemia P388 se eliminó en condiciones estériles. La ascitis se diluyó en solución salina normal (1:6 para la ascitis a solución salina normal) para preparar la suspensión celular. A continuación, se inyectaron 0,2 mL de la suspensión celular por vía intraperitoneal. Veinticuatro horas después de trasplantar las células cancerosas a los ratones, se administraron a los ratones dosis determinadas de una dosis dada de ACEA100108, o solo disolvente que sirve como control negativo, o con 10 mg/kg de Taxol y con 2 mg/kg de MMC (mitomicina C) que sirvió como controles positivos, o con 50 mg/kg DBTS que sirvió como ensayo de referencia. La vida útil de los ratones portadores se determinó en el plazo de 30 días. La razón de la duración de vida en comparación con el grupo de control negativo de los ratones portadores en cada grupo de tratamiento compuesto se calculó de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ de Razón de duración de vida} = \frac{\text{duración de vida de promedio para el grupo de tratamiento con compuesto}}{\text{duración de vida promedio para el grupo de control negativo}} \times 100 \quad (4)$$

Resultados. En el modelo de cáncer de pulmón de Lewis, ACEA100108 mostró el promedio de tasas de inhibición tumoral *in vivo* de 60,15%, 55,35% y 34,32%, respectivamente, en los grupos de dosificación de 100 (solo con 5 administraciones debido a la toxicidad), 25 y 6,25 mg/kg (con respecto al control solo con disolvente). En el mismo experimento, el DBTS mostró el promedio de tasas de inhibición tumoral *in vivo* de 63,10% y 57,93%, respectivamente, en 100 (solo con 5 administraciones debido a la toxicidad) y en grupos de dosificación de 25 mg/kg, y el Taxol mostró una tasa de inhibición tumoral *in vivo* de 43,91% para la dosis de administración habitual de 10 mg/kg. Los resultados se resumen en la Tabla 16.

En el modelo de leucemia linfocítica murina, el aumento promedio de la esperanza de vida de los ratones tratados con el compuesto ACEA100108 fue de 106,18%, 107,22% y 109,28%, respectivamente, en los grupos de dosificación de 50, 25 y 12,5 mg/kg. En el mismo experimento, el aumento promedio de la duración de la vida de los ratones fue de 109,28% para los ratones tratados con compuesto DBTS a una dosis de 50 mg/kg, y el aumento promedio en la vida de los ratones tratados con 10 mg/kg de compuesto Taxol fue de 109,28%. Los detalles se

proporcionan en la Tabla 17.

En el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano Bcap-37 en ratones atímicos, ACEA100108 mostró el promedio en las tasas de inhibición tumoral *in vivo* de 64,13%, 56,10% y 31,40%, respectivamente, en los grupos de dosificación de 50, 25 y 8 mg/kg. En el mismo experimento, el DBTS mostró el promedio en la tasa de inhibición tumoral *in vivo* de 66,98% para una dosis de 50 mg/kg y el Taxol mostró un promedio en la tasa de inhibición tumoral *in vivo* de 48,84% para la dosis de administración habitual de 10 mg/kg. Los detalles se proporcionan en la Tabla 18 y la Figura 16, que describen un estudio de eficacia de DBTS y ACEA 100108 en trasplante de xenoinjerto de cáncer de mama humano Bcap-37 en ratones atímicos. En la Figura 16, las siete filas (1-7, respectivamente) representan los resultados de los siguientes compuestos administrados: 1) control negativo; 2) disolvente; 3) ACEA 100108 (50 mg/kg); 4) ACEA 100108 (20 mg/kg); 5) ACEA 100108 (8 mg/kg); 6) DBTS (50 mg/kg); y 7) control positivo (taxol, 10 mg/kg). Los compuestos de ensayo y los controles se administraron iv x 7qd. Los cambios dinámicos en el tamaño del tumor se resumen en la Tabla 19 y la Figura 17. El cambio dinámico en el peso corporal de los resultados de los ratones portadores se resume en la Tabla 20 y la Figura 18.

En el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón humano HCT-8 en ratones atímicos, ACEA100108 mostró el promedio en las tasas de inhibición tumoral *in vivo* de 45,62%, 28,10% y 15,03%, respectivamente, en 50, 25 y 8 mg/kg de grupos de dosificación. En el mismo experimento, el DBTS mostró el promedio en la tasa de inhibición tumoral *in vivo* de 46,08% para una dosis de 50 mg/kg y el Taxol mostró un promedio en la tasa de inhibición tumoral *in vivo* de 33,33% para la dosis de administración habitual de 10 mg/kg. Los detalles se proporcionan en la Tabla 21 y la Figura 19, que describen un estudio de eficacia de DBTS y ACEA 100108 en xenoinjerto de cáncer de colon humano HCT-8 trasplantado en ratones atímicos. En la Figura 19, las siete filas (1-7, respectivamente) representan los resultados de los siguientes compuestos administrados: 1) control negativo; 2) disolvente; 3) ACEA 100108 (50 mg/kg); 4) ACEA 100108 (20 mg/kg); 5) ACEA 100108 (8 mg/kg); 6) DBTS (50 mg/kg); y 7) control positivo (taxol, 10 mg/kg). Los compuestos de ensayo y los controles se administraron iv x 7qd. Los cambios dinámicos en el tamaño del tumor se resumen en la Tabla 22 y la Figura 20. El cambio dinámico en el peso corporal de los resultados de los ratones portadores se resume en la Tabla 23 y la Figura 21.

En base a los resultados de la evaluación de dos modelos de tumor de ratón *in vivo* y dos modelos de xenoinjerto de tumor humoral, ACEA100108 puede administrarse eficazmente a 50 mg/kg y iv X 7qd. Además, el efecto anticanceroso de ACEA100108 en el modelo de cáncer de pulmón de Lewis en ratón y el modelo de cáncer de mama humano Bcap-37 es más fuerte que su efecto en el modelo de cáncer de colon humano HCT-8. Sin embargo, ACEA100108 no mostró efecto anticanceroso en el modelo de leucemia de ratón P388. Además, para la misma dosificación y el mismo procedimiento de administración de fármaco, el efecto anticanceroso para los modelos anteriores de compuesto ACEA100108 es comparable con el de DBTS, y es mejor que el de Taxol en condiciones de dosificación de tratamiento de rutina.

Tabla 16.

Eficacia antitumoral <i>in vivo</i> del compuesto ACEA100108 en el modelo de cáncer de Lewis de ratón mediante siembra subcutánea.						
Muestra	Dosis mg/kg/d	Método de administración	Núm. de animales comienzo/final	Peso del animal (g) comienzo/final	Peso del tumor (g) X ± DT	Tasa de inhibición (%)
ACEA100108	100	iv × 7qd	10/8	20,6/23,4	1,08±0,17***	60,15
ACEA100108	25	iv × 7qd	10/10	20,1/24,2	1,21±0,22***	55,35
ACEA100108	6,25	iv × 7qd	10/10	20,3/24,4	1,78±0,24***	34,32
ACEA100101	100	iv × 7qd	10/6	20,7/23,1	1,00±0,15***	63,10
ACEA100101	25	iv × 7qd	10/10	20,5/23,6	1,14±0,17***	57,93
Control positivo (Taxol)	10	iv × 7qd	10/10	20,4/23,8	1,52±0,15*** 1,52±0,15	43,91
Control negativo	Disolvente	iv × 7qd	20/20	20,3/24,7	2,71±0,26	

*** P <0,01, en comparación con el grupo de control negativo

(ACEA100101 No forma parte de la invención).

40

Tabla 17.

Eficacia antitumoral <i>in vivo</i> del compuesto ACEA100108 en el modelo de leucemia linfocítica P388 murino (transplantado mediante inyección de células cancerosas en la cavidad peritoneal de ratones anfitriones).						
Muestra	Dosificación mg/kg/d	Método de administración	Núm. de animales comienzo/final	Peso inicial de los animales (g)	Promedio de duración de vida X ± DT	% de razón de duración de vida
ACEA100108	50	iv × 7qd	10/0	20,4	10,3±0,95	106,18
ACEA100108	25	iv × 7qd	10/0	20,4	10,4±1,17	107,22
ACEA100108	12,5	iv × 7qd	10/0	20,1	10,6±0,84	109,28
ACEA100101	50	iv × 7qd	10/0	20,7	10,6±1,26	109,28
Control positivo (Taxol)	10	iv × 7qd	10/0	20,2	10,5±1,18	108,25
Control positivo (MMC)	2	iv × 7qd	10/1	20,6	18,1±0,15***	186,59
Control negativo	Disolvente	iv × 7qd	20/0	20,0	9,7±0,66	

***p <0,01, en comparación con el grupo de control negativo.
Nota: En general, se considera que un compuesto tiene eficacia antitumoral cuando la razón de la duración de vida de los ratones portadores en el grupo de tratamiento es superior al 125%.

Tabla 18.

Eficacia antitumoral <i>in vivo</i> del compuesto ACEA100108 en cáncer de mama humano Bcap-37 que fue transplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.								
Muestra	Dosificación mg/kg/d	Método de administración	Núm. de animales comienzo/final	Peso del animal (g) comienzo/final	peso tumoral (g) X ± DT	Tasa de inhibición tumoral%	Volumen Tumoral VT (cm ³)	Tasa de inhibición de VT % T/C
ACEA100108	50	iv × 7qd	6/6	18,1/23,0	0,617±0,09***	64,13	0,310	17,67
ACEA100108	20	iv × 7qd	6/6	17,6/23,0	0,755±0,09***	56,10	0,488	27,82
ACEA100108	8	iv × 7qd	6/6	18,0/23,0	1,18±0,23***	31,40	0,985	56,15
ACEA100101	50	iv × 7qd	6/6	18,0/22,8	0,568±0,07***	66,98	0,196	11,17
Control positivo Taxol	10	iv × 7qd	6/6	18,1/23,3	0,88±0,17***	48,84	0,685	39,05
Control negativo	Disolvente	iv × 7qd	12/12	18,0/23,5	1,72±0,19		1,754	

***P <0.01, en comparación con el grupo de control negativo.

Tabla 19.

Cambio dinámico de tamaño del tumor en el análisis de eficacia antitumoral <i>in vivo</i> del compuesto ACEA100108 sobre el cáncer de mama humano Bcap-37 que fue transplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.								
Muestra	Dosis mg/kg	Método de administración	Volumen tumoral (cm ³) Días después del trasplante del tumor					
			7 días	14 d	21 d	24 d		
Control negativo	Disolvente	iv × 7 qd	0,01	10/12 ††	0,254±	0,06	0,858± 0,06	1,754± 0,37
Taxol	10mg/kg	iv × 7 qd	0,01	4/6 ††	0,065±	0,02	0,249± 0,07	0,685± 0,14
ACEA100108	50mg/kg	iv × 7 qd	0,01	3/6 ††	0,023±	0,02	0,112± 0,03	0,31± 0,05

Cambio dinámico de tamaño del tumor en el análisis de eficacia antitumoral <i>in vivo</i> del compuesto ACEA100108 sobre el cáncer de mama humano Bcap-37 que fue transplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.									
Muestra	Dosis mg/kg	Método de administración	Volumen tumoral (cm ³) Días después del trasplante del tumor				0,03	0,02	0,01
			7 días	14 d	21 d	24 d			
ACEA100108	20 mg/kg	iv × 7 qd	0,01	516 ††	0,049±	0,03	0,167± 0,03	0,488± 0,07	
ACEA100108	8 mg/kg	iv × 7 qd	0,01	4/6 ††	0,068±	0,02	0,214± 0,04	0,985± 0,4	
ACEA100101	50 mg/kg	iv × 7 qd	0,01	2/6 ††	0,014±	0,01	0,079± 0,01	0,196± 0,02	

10/12 ††: significa que de un total de 12 ratones, 10 tenían un tamaño de tumor suficientemente grande cuando se palpan estos ratones, se puede sentir un tumor en cada ratón.

Tabla 20.

Cambio dinámico en el peso corporal de los ratones portadores en el ensayo de eficacia antitumoral <i>in vivo</i> del compuesto ACEA100108 sobre el cáncer de mama humano Bcap-37 que fue transplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.							
Muestras	Dosificación (mg/kg/d)	Método de administración	Peso corporal de los ratones (g)				
			día 0	día 7	d 14	d 21	d 24
Control negativo	Disolvente	iv × 7 qd	18±0,9	20,2±0,9	21,9±1,1	23,2±1,2	23,5±0,9
Taxol	10	iv × 7 qd	18,1±1,1	19,7±1	21,7±1	22,8±1,2	23,3±1,2
ACEA100108	50	iv × 7 qd	18,1±1,1	18,8±0,8	20,5±1	22,2±1,2	23±1,2
ACEA100108	20	iv × 7 qd	17,6±0,8	19,7±1	20,8±1	22,7±1,2	23±1,2
ACEA100108	8	iv × 7 qd	18±0,6	19,5±1	21,5±1	22,3±1,6	23±1,5
ACEA100101	50	iv × 7 qd	18±1	18,7±0,8	20,3±0,8	22±0,6	22,8±1,6

Tabla 21.

Eficacia antitumoral <i>in vivo</i> del compuesto ACEA100108 sobre el cáncer de colon humano HCT-8 que fue transplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.								
Muestra	Dosis (mg/kg/d)	Método de administración	Núm. de animales comienzo/final	Peso del animal (g) comienzo/final	peso tumoral (g) X ± DT	Tasa de inhibición tumoral %	Tumor volumen VT (cm ³)	Tasa de inhibición de VT % T/C
ACEA100108	50	iv × 7qd	6/6	18,3/20,3	0,832±0,10***	45,62	0,525	33,63
ACEA100108	20	iv × 7qd	6/6	18,5/22,5	1,10±0,23	28,10	0,654	41,89
ACEA100108	8	iv × 7qd	6/6	18,8/22,5	1,30±0,23	15,03	0,870	55,73
ACEA100101	50	iv × 7qd	6/6	18,2/23,0	0,825±0,07***	46,08	0,502	32,17
Control positivo Taxol	10	iv × 7qd	6/6	18,7/22,58	1,02±0,11***	33,33	0,694	44,45
Control negativo	Disolvente	iv × 7qd	12/12	18,8/23,9	1,53±0,23		1,561	

***P <0,01, en comparación con el control negativo.

5

Tabla 22,

Cambio dinámico de tamaño del tumor en el ensayo de eficacia antitumoral <i>in vivo</i> del compuesto ACEA100108 en cáncer de colon humano HCT-8 que se transplantó por xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.								
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

Muestra	Dosificación (mg/kg/d)	Método de administración	Volumen tumoral (cm ³)				
			Días después del trasplante				
			7	día	14 d	21 d	25 d
Control negativo	disolvente	iv × 7 qd	0,01	12/12††	0,253±0,07	0,911±0,2	1,561±0,26
Taxol	10	iv × 7 qd	0,01	6/6††	0,116±0,03	0,308±0,06	0,694±0,15
ACEA100108	50	iv × 7 qd	0,01	6/6††	0,112±0,02	0,236±0,02	0,525±0,14
ACEA100108	20	iv × 7 qd	0,01	6/6††	0,122±0,04	0,317±0,05	0,654±0,09
ACEA100108	8	iv × 7 qd	0,01	6/6††	0,166±0,05	0,379±0,04	0,877±0,15
ACEA100101	50	iv × 7 qd	0,01	4/6††	0,031±0,02	0,204±0,03	0,502±0,18

4/6 ††: significa que de un total de 6 ratones, 4 tenían un tamaño de tumor suficientemente grande cuando se palpaban estos ratones, uno podía sentir el tumor.

Tabla 23.

Cambio dinámico en el peso corporal de los ratones portadores en el análisis de eficacia antitumoral *in vivo* del compuesto ACEA100108 en cáncer de colon humano HCT-8 que se trasplantó por xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.

Muestra	Dosificación (mg/kg/d)	método de administración	Peso del cuerpo del ratón (g)				
			Día 0	d 7	d 14	d 21	d 25
Control negativo	Disolvente	iv × 7 qd	18,8 ± 1	20,5 ± 0,7	21,8 ± 1,1	22,4 ± 0,9	22,9 ± 1,1
Taxol	10	iv × 7 qd	18,7 ± 1	19,8 ± 1,2	21,7 ± 1,2	22,2 ± 0,8	22,5 ± 1,8
ACEA100108	50	iv × 7 qd	18,3 ± 1	17,7 ± 1,2	17,8 ± 2,3	19,5 ± 1,6	20,3 ± 1
ACEA100108	20	iv × 7 qd	18,5 ± 1	19,5 ± 1	20,7 ± 1	21,8 ± 1,2	20,3 ± 1
ACEA100108	8	iv × 7 qd	18,8 ± 0,8	19,7 ± 0,8	21,3 ± 1,2	21,8 ± 1,2	22,5 ± 1
ACEA100101	50	iv × 7 qd	18,2± 1,2	18,8 ± 1	19,5±1	20,7±0,8	23±1,3

Ejemplo 4

5

Actividad anticancerosa *in vivo* de ACEA100108 en Cáncer de ovario humano ao10/17 en ratones atímicos

10

15

20

Para evaluar la eficacia anticancerosa *in vivo* del compuesto ACEA100108, se utilizó un modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario humano ao10/17 en ratones atímicos inmunodeficientes. La línea celular y los ratones se mantuvieron en el Laboratorio de Farmacología del Instituto de Industria Farmacéutica de Shanghai. Para los modelos de xenoinjerto de cáncer de ovario humano ao10/17, las células cancerosas se pasaron dos veces *in vivo* antes de ser trasplantado a los ratones atímicos para el estudio. En otras palabras, las células ao10/17 de cáncer de ovario humano cultivadas en matraz fueron trasplantadas primero con xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes. Después de que las células cancerosas crecieron hasta un tumor de ciertos tamaños en los ratones atímicos, el tumor se retiró de los ratones atímicos y se diseccionaron los tejidos tumorales. Las suspensiones celulares se prepararon a partir del tejido tumoral disecado y se trasplantaron nuevamente a ratones atímicos inmunodeficientes (es decir, el segundo pase de las células cancerosas en el modelo trasplantado de xenoinjerto de cáncer humano). Después de que las células cancerosas crecieron hasta cierto tamaño, el tumor se retiró de los ratones atímicos y los tejidos tumorales se disecaron. Las suspensiones celulares se prepararon a partir de tejidos diseccionados y se utilizaron para el estudio de modelos de xenoinjerto de cáncer humano descritos aquí.

25

Los ratones para los experimentos fueron las cepas C₅₇BL/6, DBF1 y BALB/c (ratones atímicos), proporcionadas por Academic Sinica, Experimental Animal Center, número de certificación: SCXK (Shanghai) 2003-0003. El peso del ratón estaba entre 18 y 22 g. Solo se utilizaron ratones hembra en este estudio. Para el modelo de xenoinjerto de tumor humano, el número de animales sometidos a ensayo fue el siguiente: 6 para cada grupo de dosis, 6 para el grupo de control positivo y 12 para el grupo de control negativo (solo disolvente). Las dosis altas, medias y bajas de ACEA100108 fueron 50, 25 y 8 mg/kg/d, respectivamente.

30

Control de ensayo Para el control negativo, a cada ratón se le administró por vía intravenosa solo disolvente que tenía el mismo volumen y la misma concentración que los utilizados en el ensayo con dosis alta de ACEA100108,

una vez al día, durante 7 días consecutivos. Para el grupo de control positivo, un compuesto anticanceroso, se administró Taxol por vía intravenosa a 10 mg/kg, una vez al día durante 7 días consecutivos. En un grupo de referencia, se administró DBTS por vía intravenosa a 50 mg/kg, una vez al día durante 7 días consecutivos.

5 Preparación y administración de compuestos de ensayo. El compuesto ACEA100108 se disolvió en aceite de ricino hidrogenado (disolvente) para tener una concentración de compuesto ACEA100108 de 20 mg/ml en el disolvente. Cada vez antes de su uso, esta solución se diluyó en solución salina normal para lograr las concentraciones deseadas de ACEA100108. A cada ratón (aproximadamente 20 g de peso) se le administró por vía intravenosa la solución del compuesto de 0,5 mL a una velocidad de inyección controlada de 0,5 mL/0,5 min. Veinticuatro horas después del trasplante tumoral, se realizaron inyecciones intravenosas de soluciones de compuestos en ratones portadores una vez al día, durante 7 días consecutivos. La dosis alta, media y baja del compuesto ACEA100108 fue de 50, 20 y 8 mg/kg, respectivamente.

15 Preparación de células tumorales para el trasplante y determinación de la eficacia del compuesto. Para preparar las células cancerosas para el modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario humano, los tumores de crecimiento rápido se eliminaron primero de los ratones con tumores trasplantados. Los tejidos tumorales se trituraron en solución salina normal (1:6 para el volumen tumoral con respecto al volumen de solución salina) y se prepararon suspensiones de células tumorales en la solución salina normal. Se inyectaron por vía subcutánea 0,2 mL de suspensión celular en la región axilar (lado derecho) de cada ratón. Veinticuatro horas después del trasplante, a los ratones se les administró una dosis determinada de ACEA100108, o solo disolvente que sirvió como control negativo, o con 10 mg/kg de Taxol que sirvió como control positivo, o con 50 mg/kg de DBTS que sirvió como ensayo de referencia. Entre dos y cuatro semanas después del trasplante, los ratones se sacrificaron y los tumores trasplantados se retiraron de los ratones experimentales. Cada tumor sólido retirado se pesó; la tasa de inhibición tumoral en cada grupo de dosificación se calculó de acuerdo con la ecuación (2) en el Ejemplo 1.

25 Para el modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario humano, todos los materiales utilizados, incluidos alimentos para animales, jaulas de animales, materiales de soporte y aparatos que se ponen en contacto con los animales, fueron esterilizados a alta presión. Se mantuvieron ratones atímicos en estantes de flujo laminar en condiciones de SPF. Después del trasplante del tumor, el peso del ratón y el tamaño del tumor en cada grupo de dosificación del compuesto se controlaron dinámicamente y se trazaron. El tamaño del tumor se determinó midiendo el eje principal (a) y el eje secundario (b) del tumor, y el volumen del tumor se calculó de acuerdo con la ecuación (3) en el Ejemplo 3.

35 Resultados. En el modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario humano ao10/17 en ratones atímicos, ACEA100108 mostró el promedio en las tasas de inhibición tumoral *in vivo* de 53,40%, 46,67% y 33,19%, respectivamente, en grupos de dosificación de 50, 25 y 8 mg/kg. En el mismo experimento, el DBTS mostró el promedio en la tasa de inhibición tumoral *in vivo* de 57,30% para una dosis de 50 mg/kg y el Taxol mostró un promedio en la tasa de inhibición tumoral *in vivo* de 45,39% para la dosis de administración habitual de 10 mg/kg. Los detalles se proporcionan en la Tabla 24 y la Figura 22, que describen un estudio de eficacia de DBTS y ACEA 100108 sobre xenoinjerto de cáncer de ovario humano ao10/17 trasplantado en ratones atímicos. En la Figura 22, las siete filas (1-7, respectivamente) representan los resultados de los siguientes compuestos administrados: 1) control negativo; 2) disolvente; 3) ACEA 100108 (50 mg/kg); 4) ACEA 100108 (20 mg/kg); 5) ACEA 100108 (8 mg/kg); 6) DBTS (50 mg/kg); y 7) control positivo (taxol, 10 mg/kg). Los compuestos de ensayo y los controles se administraron iv a 7qd.

45 Los cambios dinámicos en el tamaño del tumor se resumen en la Tabla 25 y la Figura 23. El cambio dinámico en el peso corporal de los resultados de los ratones portadores se resume en la Tabla 26 y la Figura 24. Para la misma dosificación y el mismo procedimiento de administración de fármaco, el efecto anticanceroso del compuesto ACEA100108 en modelos de cáncer de ovario humano ao10/17 es comparable con el del compuesto ACEA100101, y es mejor que el de Taxol en condiciones de dosificación de tratamiento regular.

50

Tabla 24.

Eficacia antitumoral <i>in vivo</i> del compuesto ACEA100108 en xenoinjerto de cáncer de ovario humano ao10/17 trasplantado en ratones atímicos inmunodeficientes (tumor trasplantado subcutáneamente).						
Muestra	Dosis mg/kg/d	Método de administración	Núm. de animales comienzo/final	Peso corporal (g) comienzo/final	Peso del tumor (g) X ± DT	Tasa de inhibición de tumor %
ACEA100108	50	iv × 7qd	6/6	17,2/21,3	0,657±0,13***	53,40
ACEA100108	20	iv × 7qd	6/6	17,2/22,0	0,752±0,12***	46,67
ACEA100108	8	iv × 7qd	6/6	17,7/22,2	0,942±0,14***	33,19
ACEA100101	50	iv × 7qd	6/6	17,3/21,3	0,602±0,10***	57,30

Eficacia antitumoral *in vivo* del compuesto ACEA100108 en xenoinjerto de cáncer de ovario humano ao10/17 trasplantado en ratones atímicos inmunodeficientes (tumor trasplantado subcutáneamente).

Muestra	Dosis mg/kg/d	Método de administración	Núm. de animales comienzo/final	Peso corporal (g) comienzo/final	Peso del tumor (g) X ± DT	Tasa de inhibición de tumor %
Control positivo (Taxol)	10	iv × 7qd	6/6	17,8/22,5	0,77±0,12***	45,39
Control negativo	Disolvente	iv × 7qd	12/12	17,8/23,0	1,41±0,17	

***P <0,01, en comparación con el control negativo.

Tabla 25.

El cambio dinámico en el tamaño del tumor en el *in vivo* ensayo de eficacia antitumoral del compuesto ACEA100108 sobre cáncer de ovario humano ao10/17 que fue trasplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes (tumor trasplantado subcutáneamente).

Muestra	Dosificación mg/kg	Método de administración	Volumen tumoral (cm ³) Días después del trasplante del tumor			
			7D	14d	21d	24d
Control negativo	Disolvente	iv × 7 qd	0,01± 7/12††	0,213± 0,03	0,985± 0,03	1,648± 0,22
Taxol	10	iv × 7 qd	0,01± 2/6††	0,033± 0,02	0,196± 0,03	0,349± 0,08
ACEA100108	50	iv × 7 qd	0,01± 1/6††	0,01± 6/6††	0,148± 0,02	0,316± 0,06
ACEA100108	20	iv × 7 qd	0,01± 2/6††	0,03± 0,02	0,206± 0,03	0,402± 0,1
ACEA100108	8	iv × 7 qd	0,01± 3/6††	0,048± 0,03	0,249± 0,05	0,89± 0,39
ACEA100101	50	iv × 7 qd	0,01± 2/6††	0,01± 6/6††	0,129± 0,01	0,225± 0,04

7/12 ††: significa que de un total de 12 ratones, 7 tenían un tamaño de tumor suficientemente grande cuando se palpaba el ratón, se podía sentir el tumor.

Tabla 26.

Cambio dinámico en el peso corporal de los ratones portadores en el ensayo de eficacia antitumoral *in vivo* del compuesto ACEA100108 sobre el cáncer de ovario humano ao10/17 que fue trasplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.

Muestra	Dosis (mg/kg)	Método de administración	Peso corporal de los ratones (g)				
			d 0	d 7	d 14	d 21	d 24
Control negativo	Disolvente	iv × 7 qd	17,8± 1,1	20,3± 0,8	20,9±0,9	21,9±0,9	23,0±1
Taxol	10	iv × 7 qd	17,8± 1,2	19± 0,9	22,7±1,2	21,0±0,9	22,5±1
ACEA100108	50	iv × 7 qd	17,2± 0,8	16,7± 0,8	17,8±1,5	19,3±1	21,3±1,2
ACEA100108	20	iv × 7 qd	17,2± 1,2	18,3± 0,8	19,8±0,8	20,5±1	22,0±1,4
ACEA100108	8	iv × 7 qd	17,7± 0,5	19± 0,6	20,5±1	21,2±0,8	22,2±0,8
ACEA100101	50	iv × 7 qd	17,3± 1	17,3± 1,4	18,8±1,2	19,5±1	21,3±1,2

5

Ejemplo 5**Actividad anticancerosa *in vivo* de ACEA100108 en Cáncer de mama humano Bcap-37 en Ratones atímicos**

10 Para evaluar la eficacia anticancerosa *in vivo* del compuesto ACEA100108, se utilizó el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano Bcap-37 en ratones atímicos inmunodeficientes. El modelo de línea celular y ratón se mantiene en el Laboratorio de Farmacología del Instituto de Industria Farmacéutica de Shanghai. Para los modelos de xenoinjerto de cáncer de mama humano Bcap-37, las células cancerosas se pasaron dos veces *in vivo* antes de ser trasplantadas a los ratones atímicos para el estudio. En otras palabras, se trasplantaron células Bcap-37 de

cáncer de mama humano cultivadas en matraz fueron transplantadas primero con xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes. Después de que las células de cáncer de mama crecieron hasta un tumor de ciertos tamaños en los ratones atímicos, el tumor se retiró de los ratones atímicos y se diseccionaron los tejidos tumorales. Las suspensiones celulares se prepararon a partir del tejido tumoral disecado y se trasplantaron nuevamente a ratones atímicos inmunodeficientes (es decir, el segundo pase de las células cancerosas en el modelo transplantado de xenoinjerto de cáncer humano). Después de que las células cancerosas crecieron hasta cierto tamaño, el tumor se retiró de ratones atímicos y los tejidos del tumor se disecaron. Las suspensiones celulares se prepararon a partir de tejidos diseccionados y se utilizaron para el estudio de modelos de xenoinjerto de cáncer humano descritos aquí.

Los ratones para experimentos fueron cepas BALB/c (ratones atímicos), proporcionadas por Academic Sinica, Experimental Animal Center, número de certificación: SCXK (Shanghai) 2003-0003. El peso del ratón estaba entre 18 y 22 g. Solo se utilizaron ratones hembra en este estudio. Para el modelo de xenoinjerto de tumor humano, el número de animales sometidos a ensayo fue el siguientes: 6 para cada grupo de dosis, 6 para el grupo de control positivo y 12 para el grupo de control negativo (solo disolvente). Las dosis altas, medias y bajas de ACEA00108 fueron 50, 25 y 8 mg/kg/d, respectivamente.

Control de ensayo. Para el control negativo, a cada ratón se le administró por vía intravenosa el disolvente que solo tenía el mismo volumen y la misma concentración que los utilizados en la prueba con dosis alta de ACEA100108, una vez al día, durante 7 días consecutivos. Para el grupo de control positivo, un compuesto anticanceroso, se administró Taxol por vía intravenosa a 10 mg/kg, una vez al día durante 7 días consecutivos.

Preparación y administración de compuestos de ensayo. El compuesto ACEA100108 se disolvió en aceite de ricino hidrogenado (disolvente) para tener una concentración de ACEA100108 de 20 mg/ml en el disolvente. Cada vez antes de su uso, esta solución se diluyó en solución salina normal para lograr las concentraciones deseadas de ACEA100108. A cada ratón (aproximadamente 20 g de peso) se le administró por vía intravenosa la solución del compuesto de 0,5 mL a una velocidad de inyección controlada de 0,5 mL/0,5 min. Siete días después del trasplante del tumor, los tumores trasplantados crecieron hasta un tamaño lo suficientemente grande como para poder sentirlo con las manos cuando se palpaba el animal. A partir de ese momento, se realizaron una vez al día inyecciones intravenosas de soluciones de compuestos en ratones portadores, durante 7 o 10 días consecutivos. La dosis alta, media y baja de ACEA100108 fue de 50, 20 y 8 mg/kg, respectivamente.

Preparación de células tumorales para el trasplante y determinación de la eficacia del compuesto. Para preparar las células cancerosas para el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano, los tumores de crecimiento rápido se retiraron primero de los ratones con tumores trasplantados. Los tejidos tumorales se trituraron en solución salina normal (1:6 para el volumen tumoral con respecto a volumen salino) y las suspensiones de células tumorales se prepararon en la solución salina normal que tenía una concentración celular de $2-4 \times 10^7$ células/ml. Se inyectaron por vía subcutánea 0,2 mL de suspensión celular en la región axilar (lado derecho) de cada ratón. Aproximadamente siete días después del trasplante, los tumores en los ratones crecieron hasta un tamaño suficiente como para que el tumor se pudiera sentir con las manos cuando se palpaban los animales. A partir de ese momento, a los ratones se les administró una dosis determinada de ACEA100108, o solo disolvente que sirve como control negativo, o con 10 mg/kg de Taxol que sirvió como control positivo. Entre tres y cuatro semanas después del trasplante, los ratones se sacrificaron y los tumores trasplantados se retiraron de los ratones experimentales. Cada tumor sólido retirado se pesó; la tasa de inhibición tumoral en cada grupo de dosificación se calculó de acuerdo con la ecuación (2) en el Ejemplo 1. Sobre la base del volumen tumoral, también se calculó otro parámetro, a saber, la tasa de inhibición del volumen tumoral, de acuerdo con

$$T/C (\%) = \frac{\text{volumen medio del tumor en el grupo tratado con el compuesto}}{\text{volumen medio del tumor en el grupo de control negativo}} \times 100 \quad (5)$$

Para el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano, todos los materiales utilizados, incluyendo alimentos para animales, jaulas de animales, materiales de soporte y aparatos que se ponen en contacto con los animales, fueron esterilizados a alta presión. Los ratones atímicos se mantuvieron en estantes de flujo laminar en condiciones de SPF. Después del trasplante del tumor, el peso del ratón y el tamaño del tumor en cada grupo de dosificación del compuesto se controlaron dinámicamente y se registraron. El tamaño del tumor se determinó midiendo el eje principal (a) y el eje secundario (b) del tumor, y el volumen del tumor se calculó de acuerdo con la ecuación (3) del Ejemplo 3.

Resultados. En el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano Bcap-37 en ratones atímicos, ACEA100108 mostró el promedio en las tasas de inhibición tumoral *in vivo* de 52,24%, 47,31% y 28,21%, respectivamente, en los grupos de dosificación de 50, 20 y 8 mg/kg cuando el compuesto se administró de acuerdo con el procedimiento iv X 7qd. Además, mostró el promedio en las tasas de inhibición tumoral *in vivo* de 56,92% para una dosificación de 50 mg/kg cuando el compuesto se administró de acuerdo con el procedimiento 10 x qd. En el mismo experimento, el Taxol mostró un promedio en la tasa de inhibición tumoral *in vivo* de 44,33% para la dosis de administración habitual de 10 mg/kg. Los detalles se proporcionan en la Tabla 27 y la Figura 25, que describen un estudio de eficacia de

- 5 ACEA 100108 en trasplante de xenoinjerto de cáncer de pulmón humano Bcap-37 en ratones atímicos. En la Figura 25, las siete filas (1-7, respectivamente) representan los resultados de los siguientes compuestos administrados: 1) control negativo; 2) disolvente; 3) ACEA 100108 (50 mg/kg); 4) ACEA 100108 (20 mg/kg); 5) ACEA 100108 (8 mg/kg); 6) ACEA 100108 (50 mg/kg); y 7) control positivo (taxol, 10 mg/kg). Los compuestos de ensayo y los controles se administraron iv a 7qd, excepto para ACEA 100108 a 50 mg/kg, que se administró iv x 10qd. El resultado de las tasas de inhibición del volumen tumoral se muestra en la Tabla 28. Los cambios dinámicos en el tamaño del tumor se resumen en la Tabla 26. El cambio dinámico del peso corporal de los resultados de los ratones portadores se resume en la Tabla 27.
- 10 En el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano Bcap-37 en ratones atímicos, ACEA100108 mostró una tasa de inhibición tumoral superior al 50% para un procedimiento de administración de compuesto en donde se administró el compuesto después de que el tumor creció lo suficiente como para que el tumor se pudiera sentir con las manos. Además, cuando aumentaron los tiempos de dosificación del compuesto en los ratones atímicos, no se observó un aumento del efecto tóxico para los ratones, mientras que hubo un aumento de la inhibición tumoral.
- 15 Además, la dosis media de ACEA100108 administrada aquí en ratones atímicos mostró una mejor eficacia anticancerosa que la de la dosis de tratamiento de rutina de Taxol.

Tabla 27.

Eficacia antitumoral *in vivo* del compuesto ACEA100108 en el xenoinjerto de cáncer de mama humano Bcap-37 trasplantado en ratones atímicos inmunodeficientes (tumor trasplantado subcutáneamente). (Basándose en el peso del tumor).

Muestra	Dosis mg/kg/d	Método de administración	Núm. de animales comienzo/final	Peso corporal (g) comienzo/final	Peso del tumor (g) X ± DT	Tasa de inhibición tumoral C-T/C %
ACEA100108	50	iv × 7qd	6/6	18,2/22,8	0,745±0,10***	52,24
ACEA100108	20	iv × 7qd	6/6	18,8/24,3	0,822±0,12***	47,31
ACEA100108	8	iv × 7qd	6/6	18,5/24,0	1,12±0,18***	28,21
ACEA100108	50	iv × 10qd	6/6	18,8/21,2	0,672±0,10***	56,92
Control positivo (Taxol)	10	iv × 7qd	6/6	18,8/24,3	0,92±0,07***	41,03
Control negativo	Disolvente	iv × 7qd	12/12	18,6/24,8	1,56±0,14	

***P <0,01, en comparación con el control negativo.

20

Tabla 28.

Eficacia antitumoral *in vivo* del compuesto ACEA100108 en el xenoinjerto de cáncer de mama humano Bcap-37 trasplantado en ratones atímicos inmunodeficientes (tumor trasplantado subcutáneamente). (Basándose en el volumen del tumor)

Muestra	Dosis mg/kg/d	Método de administración	Núm. de animales comienzo/final	Peso corporal (g) comienzo/final	Volumen tumoral (g) X ± DT	Inhibición del volumen tumoral T/C %
ACEA100108	50	iv × 7qd	6/6	18,2/22,8	0,485±0,06***	26,91
ACEA100108	20	iv × 7qd	6/6	18,8/24,3	0,740±0,18***	41,06
ACEA100108	8	iv × 7qd	6/6	18,5/24,0	0,962±0,23***	53,38
ACEA100108	50	iv × 10qd	6/6	18,8/21,2	0,280±0,04***	15,53
Control positivo (Taxol)	10	iv × 7qd	6/6	18,8/24,3	*** 0,799±0,23	44,33
Control negativo	Disolvente	iv × 7qd	12/12	18,6/24,8	1,802±0,43	

***P <0,01, en comparación con el control negativo.

Tabla 29.

Cambio dinámico en el tamaño del tumor en el ensayo de eficacia antitumoral <i>in vivo</i> del compuesto ACEA100108 sobre el cáncer de mama humano Bcap-37 que fue trasplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes (tumor trasplantado subcutáneamente).							
Muestra	Dosis mg/kg	Método de administración	Volumen tumoral (cm ³) Días después del trasplante del tumor				
			7d	14d	21d	24d	
Control negativo	Disolvente	iv × 7 qd	0,01	12/12††	0,282± 0,07	0,962± 0,25	1,802± 0,43
Taxol	10	iv × 7 qd	0,01	6/6††	0,103± 0,02	0,283± 0,05	0,799± 0,23
ACEA100108	50	iv × 7 qd	0,01	6/6††	0,049± 0,02	0,169± 0,03	0,485± 0,06
ACEA100108	20	iv × 7 qd	0,01	6/6††	0,087± 0,01	0,23± 0,04	0,74± 0,18
ACEA100108	8	iv × 7 qd	0,01	6/6††	0,107± 0,02	0,27± 0,03	0,962± 0,23
ACEA100108	50	iv × 10 qd	0,01	6/6††	0,048± 0,03	0,114± 0,02	0,28± 0,04

12/12 ††: significa que de un total de 12 ratones, todos tenían un tamaño de tumor suficientemente grande cuando se palpaba el ratón, se podía sentir el tumor.

Tabla 30.

El cambio dinámico en el peso corporal de los ratones portadores en el <i>in vivo</i> ensayo de eficacia antitumoral del compuesto ACEA100108 sobre el cáncer de mama humano Bcap-37 que fue trasplantado mediante xenoinjerto en ratones atímicos inmunodeficientes mediante implante subcutáneo.							
Muestra	Dosis (mg/kg)	Método de administración	Peso corporal de los ratones (g)				
			d 0	d 7	d 14	d 21	d 24
Control negativo	Disolvente	iv × 7 qd	18,6± 0,9	0,28± 1,2	21,9± 1,2	22,7± 1,2	24,8± 1,1
Taxol	10	iv × 7 qd	0,28± 1	20,5± 1	21,5± 1,6	23,0± 1,4	24,3± 0,8
ACEA100108	50	iv × 7 qd	18,2± 1,2	19,3±	22,7± 1,2	21,8± 1,5	22,8± 1,5
ACEA100108	20	iv × 7 qd	18,8± 1,2	19,5± 1	21,2± 1,5	22,3± 1,6	24,3± 0,8
ACEA100108	8	iv × 7 qd	0,28± 1	19,8± 1,5	21,7± 1,4	23,2± 1,5	24± 1,4
ACEA100108	50	iv ± 10 qd	18,8± 1	19,7± 1	20,3± 1,4	21,5± 1,8	21,2± 1,2

Ejemplo 6

5

Prueba de toxicidad aguda de DBTS y Compuesto ACEA100108:**Determinación de la inyección intravenosa DL₅₀ en Ratones**

10 Los experimentos para someter a ensayo el DBTS (que no forma parte de la invención) y la toxicidad aguda de ACEA100108 se realizaron en ratones. Los ratones de ensayo se dividieron aleatoriamente en seis grupos (cinco grupos de dosificación y un grupo de control). Cada grupo contenía 20 ratones de la cepa Kunming, y entre ellos, 50% eran machos y 50% eran hembras. Después de la administración de una dosis única de DBTS o ACEA100108 mediante inyección intravenosa (i.v.), se controlaron y registraron la respuesta aguda al compuesto DBTS o

15 ACEA100108 y la muerte de los ratones tratados durante las dos primeras semanas. El valor de DL₅₀ se calculó utilizando el método Bliss. El valor de DL₅₀ de la única dosis i.v. en ratón de DBTS fue de 258,53 mg/kg (234,96 a 284,46 mg/kg), y el valor de DL₅₀ de la única dosis i.v. en ratón de ACEA100108 fue de 316 mg/kg (284,26-351,28 mg/kg).

20 **Materiales y Método.** Los compuestos químicos de ensayo fueron DBTS y ACEA100108, que se disolvieron en aceite de ricino hidrogenado en el baño de agua precalentado y se prepararon como una solución de 20 mg/ml. La solución se diluyó adicionalmente a las concentraciones del experimento deseadas con la solución salina normal. El volumen de administración fue de 0,5 mL i.v. por ratón y la velocidad de inyección fue de 0,5 mL/0,5 min.

25 Los ratones experimentales fueron de la cepa Kunming, proporcionada por el Departamento de Animales Experimentales del Instituto de la Industria Farmacéutica de Shanghai. El número de certificado de la instalación fue

la Certificación de Instalación Animal 107. El peso medio de los ratones fue de 18-20 gramos. Cada grupo de ensayo contenía 20 ratones de la cepa Kunming, y entre ellos, 10 ratones eran machos y 10 ratones eran hembras. Se utilizaron cinco dosis experimentales, que fueron de 400 mg/kg, 320 mg/kg, 256 mg/kg, 204,8 mg/kg y 163,8 mg/kg. A los ratones del grupo control solo se les suministró el mismo volumen de disolvente, que se diluyó con aceite de ricino hidrogenado. Todos los ratones de ensayo recibieron una inyección intravenosa única de DBTS, ACEA100108, o el disolvente que sirvió como control a la velocidad de inyección de 0,5 mL/0,5 min. La respuesta aguda a DBTS, ACEA100108 o el disolvente inmediatamente después de la administración, así como el cambio de peso y la muerte en las primeras dos semanas de la administración se controlaron y registraron. Los valores de DL₅₀ de la inyección intravenosa en ratones se calcularon utilizando el método Bliss.

Resultado. Inmediatamente después de la inyección intravenosa, los ratones mostraron anomalías de comportamiento, que incluyeron saltos, carreras, convulsiones y dificultad para respirar (respiración acelerada). En los grupos de dosis altas, algunos ratones murieron por ataques convulsivos en el plazo de los 3 minutos posteriores a la inyección. La muerte ocurrió una hora después de la administración y el pico fue en la 12^a hora de la administración. No se encontraron anomalías patológicas en los órganos de los ratones muertos mediante autopsia. Los ratones supervivientes no mostraron síntomas tóxicos graves excepto las reducción de actividades tempranas y pérdida de pelo, que se recuperaron gradualmente, y no se observaron manifestaciones tóxicas diferidas durante los 14 días de seguimiento. Aunque los ratones supervivientes estaban sanos y se comportaban de manera normal, los ratones mostraron pérdida de peso hasta cierto punto. Basándose en los datos experimentales, valor de DL₅₀ de la única dosis i.v. en ratón de DBTS fue de 258,53 mg/kg (234,96 a 284,56 mg/kg), y valor de DL₅₀ de la única dosis i.v. en ratón de ACEA100108 fue 316 mg/kg (284,26-351.28 mg/kg). No hubo diferencia significativa en los valores de DL₅₀ entre ratones machos y ratones hembra (valor p > 0,05). Los resultados de toxicidad aguda para DBTS y ACEA100108 se resumieron en las Tablas 31 y 32. Para evaluar el posible efecto tóxico del disolvente en los ratones, a los ratones en el grupo control se les administró el mismo volumen de disolvente. Los ratones a los que se suministró el disolvente mostraron manifestaciones anormales tempranas y pérdida de peso en un grado menor que los ratones a los que se administraron dosis de DBTS o ACEA100108. Esto sugiere que los efectos tóxicos agudos observados en los ratones que han recibido la dosificación están relacionados con DBTS o ACEA100108.

Tabla 31.

Toxicidad aguda en los ratones Kunming a los que se les administró una única dosis de DBTS mediante inyección intravenosa.							
Sexo	Dosis mg/kg	Número de cada Animal	Distribución de animales muertos el día después de la inyección intravenosa única	Porcentaje de animales muertos %	DL ₅₀ (95% CL) g/kg	Peso promedio de los animales (g)	
			1 2 3 4 5 6 7 8 9 10---14			Comienzo	Final
Macho	400	10	1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0---0	100	261,08	20,1	--
	320	10	7 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0---0	90	(230,3~295,9)	20,1	25,0
	256	10	2 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0---0	40		20,4	26,3
	204,8	10	0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0---0	10		19,9	26,6
	163,8	10	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0---0	0		20,0	26,9
Hembra	400	10	1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0---0	100	256	19,8	--
	320	10	5 2 1 0 0 0 0 0 0 0 0---0	80	(221,7~295,5)	20,6	24,5
	256	10	3 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0---0	50		19,9	24,2
	204,8	10	0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0---0	20		20,5	24,3
	163,8	10	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0---0	0		19,9	24,5
50% Macho, 50% Hembra	400	20	20 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0---0	100	258,53		
	320	20	12 3 2 0 0 0 0 0 0 0 0---0	85	(234,9 ~284,4)		
	256	20	5 2 1 1 0 0 0 0 0 0 0---0	45			

Toxicidad aguda en los ratones Kunming a los que se les administró una única dosis de DBTS mediante inyección intravenosa.							
Sexo	Dosis mg/kg	Número de cada Animal	Distribución de animales muertos el día después de la inyección intravenosa única	Porcentaje de animales muertos %	DL ₅₀ (95% CL) g/kg	Peso promedio de los animales (g)	
			1 2 3 4 5 6 7 8 9 10---14			Comienzo	Final
	204,8	20	0 1 1 1 0 0 0 0 0 0---0	15			
	163,8	20	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0---0	0			

Tabla 32.

Toxicidad aguda en los ratones Kunming a los que se les administró una sola dosis de inyección intravenosa de ACEA100108.							
Sexo	Dosis Mg/kg	Número de animal	Distribución de animales muertos cada día después de la inyección intravenosa única	Porcentaje de animales muertos %	DL ₅₀ (95% CL) g/kg	Peso promedio de los animales	
			1 2 3 4 5 6 7 8 9 10---14			Comienzo	Final
Macho	500	10	10 0 0 0 0 0 0 0 0 0---0	100	319,3	20,3	--
	400	10	3 3 0 1 0 0 0 0 0 0---0	70	(271,9~375,0)	19,9	26,0
	320	10	0 3 1 0 0 0 0 0 0 0---0	40		20,0	26,7
	256	10	0 2 0 1 0 0 0 0 0 0---0	30		20,2	26,3
	204,8	10	0 0 1 0 0 0 0 0 0 0---0	10		20,3	26,3
	163,8	10	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0---0	0		20,4	27,0
Hembra	500	10	10 0 0 0 0 0 0 0 0 0---0	100	313,2	19,6	--
	400	10	5 2 0 1 0 0 0 0 0 0---0	80	(272,7 -359,7)	19,9	23,5
	320	10	2 2 1 0 0 0 0 0 0 0---0	50		19,9	24,6
	256	10	0 2 0 1 0 0 0 0 0 0---0	30		20,1	24,6
	204,8	10	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0---0	0		20,5	24,3
	163,8	10	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0---0	0		19,6	24,2
50% macho, 50% hembra	500	20	20 0 0 0 0 0 0 0 0 0---0	100	316		
	400	20	8 5 0 2 0 0 0 0 0 0---0	75	(284,2~351,2)		
	320	20	2 5 2 0 0 0 0 0 0 0---0	45			
	256	20	0 4 0 2 0 0 0 0 0 0---0	30			
	204,8	20	0 0 1 0 0 0 0 0 0 0---0	5			
	163,8	20	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0---0	0			

Ejemplo 7 (No forma parte de la invención)

5

Inhibición de la proliferación celular por DBTS, colcemida y paclitaxel

10

Se sembraron células H460 (células de cáncer de pulmón humano) en pocillos de dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (placas electrónicas, es decir, las placas comprenden matrices de sensores de microelectrodos en los pocillos de la placa) con una densidad de siembra inicial de 8.000 células por pocillo y se preincubaron en incubadora en condiciones convencionales de cultivo celular durante aproximadamente 22 horas. Se añadieron trisulfuro de dibencilo (DBTS), colcemida y paclitaxel a diferentes concentraciones en DMSO a los pocillos después del período de incubación. El estado de las células se controló antes y después de la adición del compuesto utilizando el sistema RT-CES. Los índices celulares de diferentes pocillos estaban entre 1,7 y 1,9 para las soluciones de DBTS y colcemida inmediatamente antes de la adición del compuesto, y entre 1,4 y 1,9 para el

15

paclitaxel. Las Figuras 1A-C muestran el índice celular normalizado en función del tiempo antes y después de la adición del compuesto. El índice celular se normalizó frente a los valores del índice celular en un punto temporal inmediatamente después de la adición del compuesto (aproximadamente 23 horas después de la siembra celular).

5 **Ejemplo 8 (No forma parte de la invención)**

Inhibición de la proliferación celular por DBTS en células MV522

10 Se sembraron células MV522 (células de cáncer de pulmón humano) en pocillos de dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (placas electrónicas, es decir, las placas comprenden matrices de sensores de microelectrodos en los pocillos de la placa) con una densidad de siembra inicial de 10.000 células por pocillo y se preincubaron en incubadora en condiciones de cultivo celular convencionales durante aproximadamente 22 horas. Se añadieron disoluciones de trisulfuro de dibencilo en DMSO a los pocillos después del período de incubación. El estado de las células se controló antes y después de la adición del compuesto utilizando el sistema RT-CES. Los índices celulares de diferentes pocillos estaban entre 1,0 y 1,6 inmediatamente antes de la adición del compuesto. La Figura 2 muestra el índice celular normalizado en función del tiempo antes y después de la adición del compuesto. El índice celular se normalizó frente a los valores del índice celular en un punto temporal inmediatamente después de la adición del compuesto (aproximadamente 23 horas después de la siembra celular).

20 **Ejemplo 9 (No forma parte de la invención)**

Inhibición de la proliferación celular por trisulfuro de dibencilo en células MCF-7

25 Se sembraron células MCF-7 (células de cáncer de mama humano) en pocillos de dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (placas electrónicas, es decir, las placas comprenden matrices de sensores de microelectrodos en los pocillos de la placa) con una densidad de siembra inicial de 10.000 células por pocillo y se preincubaron en incubadora en condiciones de cultivo celular convencionales durante aproximadamente 44 horas. La solución de trisulfuro de dibencilo en DMSO se añadió a los pocillos después del período de incubación. El estado de las células se controló antes y después de la adición del compuesto utilizando el sistema RT-CES. Los índices celulares de diferentes pocillos estaban entre 1,2 y 1,5 inmediatamente antes de la adición del compuesto. La Figura 3 muestra el índice celular normalizado en función del tiempo antes y después de la adición del compuesto. El índice celular se normalizó frente a los valores del índice celular en un punto de tiempo inmediatamente después de la adición del compuesto (aproximadamente 44,5 horas después de la siembra celular).

35 **Ejemplo 10 (No forma parte de la invención)**

Inhibición de la proliferación celular por trisulfuro de dibencilo en células A549

40 Se sembraron células A549 (células de cáncer de pulmón humano) en pocillos de dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (placas electrónicas, es decir, las placas comprenden matrices de sensores de microelectrodos en los pocillos de la placa) con una densidad de siembra inicial de 8.000 células por pocillo y se preincubaron en incubadora en condiciones de cultivo celular convencionales durante aproximadamente 17 horas. La solución de trisulfuro de dibencilo en DMSO se añadió a los pocillos después del período de incubación. El estado de las células se controló antes y después de la adición del compuesto utilizando el sistema RT-CES. Los índices celulares de diferentes pocillos estaban entre 0,72 y 1,26 inmediatamente antes de la adición del compuesto. La Figura 4 muestra el índice celular normalizado en función del tiempo antes y después de la adición del compuesto. El índice celular se normalizó frente a los valores del índice celular en un punto temporal inmediatamente después de la adición del compuesto (aproximadamente 18 horas después de la siembra celular).

50 **Ejemplo 11 (No forma parte de la invención)**

Inhibición de la proliferación celular por trisulfuro de dibencilo en células PC3

55 Se sembraron células PC3 (células de cáncer de próstata humano) en pocillos de dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (placas electrónicas, es decir, las placas comprenden matrices de sensores de microelectrodos en los pocillos de la placa) con una densidad de siembra inicial de 10.000 células por pocillo y se preincubaron en incubadora en condiciones de cultivo celular convencionales durante aproximadamente 22,5 horas. La solución de trisulfuro de dibencilo en DMSO se añadió a los pocillos después del período de incubación. El estado de las células se controló antes y después de la adición del compuesto utilizando el sistema RT-CES. Los índices celulares de diferentes pocillos estaban entre 0,34 y 0,54 inmediatamente antes de la adición del compuesto. La Figura 5 muestra el índice celular normalizado en función del tiempo antes y después de la adición del compuesto. El índice celular se normalizó frente a los valores del índice celular en un punto temporal inmediatamente después de la adición del compuesto (aproximadamente 23,5 horas después de la siembra celular).

Ejemplo 12 (No forma parte de la invención)**Inhibición de la proliferación celular por DBTS y 5-fluorouracilo en células A431**

5 Se sembraron células A431 (células de cáncer epidermoide humano) en pocillos de dispositivos de placas de microtitulación (placas electrónicas, es decir, las placas comprenden matrices de sensores de microelectrodos en los pocillos de la placa) con una densidad de siembra inicial de 10.000 células por pocillo y se preincubaron en incubadora en condiciones de cultivo celular convencionales durante aproximadamente 22,3 horas. Se añadieron diversas concentraciones de DBTS y soluciones de 5-fluorouracilo a los pocillos después del período de incubación.

10 El estado de las células se controló antes y después de la adición del compuesto utilizando el sistema RT-CES. Los índices celulares de diferentes pocillos de DBTS estaban entre 0,6 y 1,2 para DBTS, y entre 0,6 y 1,2 para 5-fluorouracilo inmediatamente antes de la adición del compuesto. Las Figuras 6A-B muestran el índice celular normalizado en función del tiempo antes y después de la adición del compuesto. El índice celular se normalizó frente a los valores del índice celular en un punto temporal inmediatamente después de la adición del compuesto (22,6 horas después de la siembra celular).

Ejemplo 13 (No forma parte de la invención)**Inhibición de Proliferación celular por DBTS en células HT1080**

20 Se sembraron células HT1080 (células de fibrosarcoma humano) en pocillos de dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (placas electrónicas, es decir, las placas comprenden matrices de sensores de microelectrodos en los pocillos de la placa) con una densidad de siembra inicial de 4.000 células por pocillo y se preincubaron en incubadora en condiciones de cultivo celular convencionales durante aproximadamente 18,6 horas.

25 La solución de trisulfuro de dibencilo en DMSO se añadió a los pocillos después del período de incubación. El estado de las células se controló antes y después de la adición del compuesto utilizando el sistema RT-CES. Los índices celulares de diferentes pocillos estaban entre 0,72 y 1,45 inmediatamente antes de la adición del compuesto. La Figura 7 muestra el índice celular normalizado en función del tiempo antes y después de la adición del compuesto. El índice celular se normalizó frente a los valores del índice celular en un punto temporal inmediatamente después de la adición del compuesto (aproximadamente 20 horas después de la siembra celular).

Ejemplo 14 (No forma parte de la invención)**Inhibición de la proliferación celular por DBTS en células MDA-231**

35 Se sembraron células MDA-231 (células de cáncer de mama humano) en pocillos de dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (placas electrónicas, es decir, las placas comprenden matrices de sensores de microelectrodos en los pocillos de la placa) con una densidad de siembra inicial de 5.000 células por pocillo y se preincubaron en incubadora en condiciones de cultivo celular convencionales durante aproximadamente 18,7 h. La solución de trisulfuro de dibencilo en DMSO se añadió a los pocillos después del período de incubación. El estado de las células se controló antes y después de la adición del compuesto utilizando el sistema RT-CES. Los índices celulares de diferentes pocillos estaban entre 0,65 y 0,82 inmediatamente antes de la adición del compuesto. La Figura 8 muestra el índice celular normalizado en función del tiempo antes y después de la adición del compuesto. El índice celular se normalizó frente a los valores del índice celular en un punto de tiempo inmediatamente después de la adición del compuesto (aproximadamente 19,6 horas después de la siembra celular).

Ejemplo 15 (No forma parte de la invención)**Inhibición de la proliferación celular por DBTS en células HT-29**

50 Se sembraron células HT-29 (células de cáncer de colon humano) en pocillos de dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (placas electrónicas, es decir, las placas comprenden matrices de sensores de microelectrodos en los pocillos de la placa) con una densidad de siembra inicial de 10.000 células por pocillo y se preincubaron en incubadora en condiciones de cultivo celular convencionales durante aproximadamente 25 horas. La solución de trisulfuro de dibencilo en DMSO se añadió a los pocillos después del período de incubación. El estado de las células se controló antes y después de la adición del compuesto utilizando el sistema RT-CES. Los índices celulares de diferentes pocillos estaban entre 0,95 y 1,13 inmediatamente antes de la adición del compuesto. La Figura 9 muestra el índice celular normalizado en función del tiempo antes y después de la adición del compuesto (aproximadamente 26 horas después de la siembra celular). El índice celular se normalizó frente a los valores del índice celular en un punto de tiempo inmediatamente antes de la adición del compuesto.

Ejemplo 16 (No forma parte de la invención)**Inhibición de la Proliferación Celular por DBTS en Células HC-2998**

Se sembraron células HC-2998 (células de cáncer de colon humano) en pocillos de dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (placas electrónicas, es decir, las placas comprenden matrices de sensores de microelectrodos en los pocillos de la placa) con una densidad de siembra inicial de 10.000 células por pocillo y se preincubaron en incubadora en condiciones de cultivo celular convencionales durante aproximadamente 24,7 horas. La solución de trisulfuro de dibencilo en DMSO se añadió a los pocillos después del período de incubación. El estado de las células se controló antes y después de la adición del compuesto utilizando el sistema RT-CES. Los índices celulares de diferentes pocillos estaban entre 0,33 y 0,68 inmediatamente antes de la adición del compuesto. La Figura 10 muestra el índice celular normalizado en función del tiempo antes y después de la adición del compuesto. El índice celular se normalizó frente a los valores del índice celular en un punto temporal inmediatamente después de la adición del compuesto (aproximadamente 25,7 horas después de la siembra celular).

Ejemplo 17 (No forma parte de la invención)

Inhibición de la proliferación celular por DBTS en células OVCAR4

Se sembraron células OVCAR4 (células de cáncer de ovario humano) en pocillos de dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (placas electrónicas, es decir, las placas comprenden matrices de sensores de microelectrodos en los pocillos de la placa) con una densidad de siembra inicial de 10.000 células por pocillo y se preincubaron en incubadora en condiciones de cultivo celular convencionales durante aproximadamente 27 horas. La solución de trisulfuro de dibencilo en DMSO se añadió a los pocillos después del período de incubación. El estado de las células se controló antes y después de la adición del compuesto utilizando el sistema RT-CES. Los índices celulares de diferentes pocillos estaban entre 1,4 y 1,7 inmediatamente antes de la adición del compuesto. La Figura 11 muestra el índice celular normalizado en función del tiempo antes y después de la adición del compuesto. El índice celular se normalizó frente a los valores del índice celular en un punto temporal inmediatamente después de la adición del compuesto (aproximadamente 28 horas después de la siembra celular).

Ejemplo 18 (No forma parte de la invención)

Inhibición de la proliferación celular por DBTS en células A2780

Se sembraron células A2780 (células de cáncer de colon humano) en pocillos de dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (placas electrónicas, es decir, las placas comprenden matrices de sensores de microelectrodos en los pocillos de la placa) con una densidad de siembra inicial de 20.000 células por pocillo y se preincubaron en una incubadora en condiciones de cultivo celular convencionales durante aproximadamente 16,4 horas. La solución de trisulfuro de dibencilo en DMSO se añadió a los pocillos después del período de incubación. El estado de las células se controló antes y después de la adición del compuesto utilizando el sistema RT-CES. Los índices celulares de diferentes pocillos estaban entre 2,2 y 3,7 inmediatamente antes de la adición del compuesto. La Figura 12 muestra el índice celular normalizado en función del tiempo antes y después de la adición del compuesto. El índice celular se normalizó frente a los valores del índice celular en un punto temporal inmediatamente después de la adición del compuesto (aproximadamente 17,5 horas después de la siembra celular).

Ejemplo 19 (No forma parte de la invención)

Respuesta de células HepG2 a DBTS

Se sembraron células HepG2 (células de hepatosarcoma humano) en pocillos de dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (placas electrónicas, es decir, las placas comprenden matrices de sensores de microelectrodos en los pocillos de la placa) con una densidad de siembra inicial de 15.000 células por pocillo y se preincubaron en incubadora en condiciones de cultivo celular convencionales durante aproximadamente 22 horas. La solución de trisulfuro de dibencilo en DMSO se añadió a los pocillos después del período de incubación. El estado de las células se controló antes y después de la adición del compuesto utilizando el sistema RT-CES. El índice celular estaba entre 0,7 y 0,97 inmediatamente antes de la adición del compuesto. La Figura 13 muestra el índice celular normalizado en función del tiempo antes y después de la adición del compuesto. El índice celular se normalizó frente a los valores del índice celular en un punto de tiempo inmediatamente después de la adición del compuesto (aproximadamente 22,7 horas después de la siembra celular). A partir de los datos del índice celular que se muestran aquí, parece que el trisulfuro de dibencilo no muestra ningún efecto de inhibición sobre la proliferación de células HepG2 y ningún efecto citotóxico sobre las células HepG2 dentro del intervalo de dosis de exposición.

Ejemplo 20

Inhibición de la proliferación de células cancerosas por DBTS y sus derivados

La potencia anticancerosa de DBTS y sus derivados se sometió a ensayo en 8 tipos diferentes de líneas celulares de cáncer humano utilizando el sistema RT-CES y el ensayo MTT. Las 8 líneas celulares de cáncer fueron HT1080

(la línea celular de fibrosarcoma humano), H460 (línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano), OVCAR4 (línea celular de cáncer de ovario humano), MCF7 (línea celular de cáncer de mama humano) MDA-MB231 (M231, línea celular de cáncer de mama humano) A2780 (línea celular de cáncer de colon humano) Jurkat (línea celular de leucemia de células T humanas). Los derivados de ensayo DBTS incluyen ACEA100107, ACEA100108, ACEA100109, ACEA100111, ACEA100115, ACEA100116, ACEA100117, ACEA100118, ACEA100119 y ACEA100120. ACEA100129 también se sometió a ensayo en células HT1080, HELA y MCF7, con un valor de CI_{50} de 0,82 μM , 0,42 μM y 2,3 μM , respectivamente. Las estructuras químicas de los derivados se muestran en las Tablas 33 y 34. (De estos compuestos, ACEA100101, ACEA100109, ACEA100115, ACEA100116, ACEA100118, ACEA100129 no son compuestos de la invención).

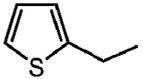
Para el análisis realizado en el sistema RT-CES, las células se sembraron en los dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (placas electrónicas, es decir, las placas comprenden matrices de sensores de microelectrodos en los pocillos de la placa) a una densidad de siembra que varía desde 5000 células/pocillo a 15.000 células/pocillo. Las células se incubaron a 5% de CO_2 y 37°C durante la noche hasta que los índices celulares alcanzaron la fase de crecimiento donde el índice celular estaba entre 0,8 y 1,2. A continuación, se añadieron compuestos en dilución seriada a las células, seguido de un control dinámico del efecto de los compuestos sobre la proliferación celular y la citotoxicidad. Los valores de CI_{50} dependientes del tiempo para cada derivado se calcularon basándose en las respuestas a la dosis del valor del índice celular en diferentes momentos después del tratamiento con el compuesto. Los valores CI_{50} mostrados en la Tabla 35 corresponden a los puntos temporales en los que el compuesto mostró la inhibición máxima después del tratamiento.

Para el ensayo MTT, las células se sembraron en las placas normales de pocillos de 96x a una densidad de siembra de células que varía de 5000 células/pocillo a 15.000 células/pocillo. Las células se incubaron a 5% de CO_2 y 37°C durante la noche. Los derivados se diluyeron seriadamente y se añadieron a las células. El tratamiento se terminó después de 48 horas de incubación mediante la adición de reactivo de tinción de MTT. Después de 4 horas, la tinción fue detenida mediante el tampón de parada y a continuación se llevó a cabo la medición colorimétrica en un lector de placa de microtitulación con una longitud de onda doble, 650 nm y 550 nm. Los valores de CI_{50} para los derivados evaluados se calcularon utilizando las lecturas colorimétricas y se enumeraron en la Tabla 36.

Tabla 33.

Derivado DBTS	R
DBTS (ACEA100101)	H
ACEA100108	<i>p</i> -F
ACEA100118	<i>p</i> -Cl
ACEA100115	<i>o</i> -Cl
ACEA100116	<i>m</i> -Me
ACEA100117	<i>m</i> -CF ₃
ACEA100129	<i>p</i> -Me

Tabla 34.

Nombre Derivado DBTS	Ar
ACEA100111	
ACEA100107	

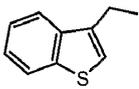
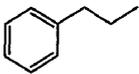
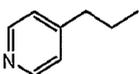
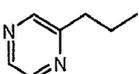
	
ACEA100109	
ACEA100120	
ACEA100119	

Tabla 35

Valores de CI_{50} (μM) de DBTS y sus derivados en 7 líneas celulares de cáncer utilizando el sistema RT-CES

Línea celular	ACEA100107	ACEA100108	ACEA100109	ACEA100111	ACEA100115
HT1080	5,3	1,3	9,4	3,6	2,2
OVCAR4	5,1	2	10,5	12,2	0,5
M231	4,8	3,05	19,1	17,5	1,06
A2780	2,65	0,5	6,25	1,3	0,75
H460	20	9,2	42,2	33,5	23,2
MCF7	5,6	2,15	8,8	6,25	7,8
HepG2	>50	>50	>50	>50	>50

Línea celular	ACEA100116	ACEA100117	ACEA100118	ACEA100119	ACEA100120	DBTS
HT1080	1,9	27,5	1,2	36	9	2,2
OVCAR4	0,6	33,5	2,25	34,8	11,5	1,75
M231	1,06	41	2,3	>50	16	2,4
A2780	0,75	11,8	0,7	17,4	4,4	0,4
H460	12,5	>50	9,6	31,5	18,2	11,1
MCF7	2,75	48,8	4,4	31,6	11,9	6,6
HepG2	>50	>50	>50	>50	>50	>50

Valores de CI_{50} (μM) de DBTS y sus derivados en 8 líneas celulares utilizando el análisis MTT

	ACEA100107	ACEA100108	ACEA100109	ACEA100111	ACEA100115
Jurkat	1,2	0,35	4,7	2,6	0,51
M231	6,6	4,4	>50	1,6	3,1
HT1080	5,3	19	20,8	34	12,4
A2780	1,05	4,7	6,3	5,35	1,5
MCF-7	>50	>50	>50	>50	>50
OVCAR4	>50	>50	>50	>50	>50
H460	27	10,25	27,4	12,5	11,75
HepG2	>50	>50	>50	>50	>50

	ACEA100116	ACEA100117	ACEA100118	ACEA100119	ACEA100120	ACEA100101
Jurkat	0,3	8	0,5	>25	7,3	0,35
M231	0,65	14,9	1,2	>50	9,7	2,4
HT1080	2,2	47,5	1,15	39,3	9	2,55
A2780	0,8	11,7	0,8	>50	15,2	1,2
MCF-7	>50	>50	>50	>50	>50	>50
OVCAR4	>50	>50	>50	>50	>50	>50
H460	5,4	<50	7,95	>50	20,8	14,2
HepG2	>50	>50	>50	>50	>50	>50

Ejemplo 21**Inhibición cinética de la proliferación de células cancerosas por ACEA100108**

La potencia anticancerosa de un derivado de DBTS, ACEA100108 se sometió a ensayo en 7 líneas de células cancerosas en el sistema RT-CEA. Las líneas celulares fueron HT1080, H460, OVCA4, MCF7, MDA-MB231, HepG2 y A2780. Las células cancerosas se sembraron en dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (es decir placas electrónicas) que contienen pocillos a una densidad de siembra celular que varía de 5000 células/pocillo a 15000 células/pocillo, y las células sembradas se incubaron a 37°C, 5% de CO₂. El crecimiento de la célula cancerosa se controló en tiempo real en el sistema RT-CES hasta que las células alcanzaron la fase de crecimiento, que tarda aproximadamente 20 horas. Las células se trataron a continuación con ACEA100108 que se diluyó seriadamente a las concentraciones que oscilaban entre 50 uM y 0,38 uM. La inhibición de la proliferación del cáncer de ACEA100108 y las respuestas de citotoxicidad de diversas líneas celulares a ACEA100108 se controlaron en el sistema RT-CES en tiempo real. Se registraron las curvas cinéticas de la interacción célula-compuesto y se muestran en la Figura 26. Las curvas del índice celular se normalizaron frente a los valores del índice celular en un momento inmediatamente posterior a la adición del compuesto (aproximadamente 18-24 horas después de la siembra celular).

Ejemplo 22**Inhibición cinética de la proliferación de células cancerosas por los derivados de DBTS**

La inhibición cinética de la proliferación de células cancerosas HT1080 y los efectos de citotoxicidad de los derivados de DBTS en células cancerosas HT1080 se midieron en el sistema RT-CES. Los derivados de DBTS son ACEA100107, ACEA100109, ACEA100111, ACEA100114, ACEA100115, ACEA100116, ACEA100117, ACEA100118, ACEA100119 y ACEA100120. (De estos compuestos, ACEA100109, ACEA100115, ACEA100116 y ACEA100118 no son parte de la invención). Las células HT1080 (fibrosarcoma humano) se sembraron en los pocillos de dispositivos de placas de microtitulación 16X o 96X (placas electrónicas) a la densidad de siembra de 5000 células/pocillo. Después de 20 horas de incubación a 5% de CO₂ y 37°C hasta que las células alcanzaron la fase de crecimiento, se añadieron a las células los derivados DBTS diluidos seriadamente a la concentración que varía de 50 uM a 0,38 uM, y la respuesta celular a los derivados DBTS fue controlada y registrada en tiempo real durante 48 horas en el sistema RT-CES. La Figura 27 muestra las curvas cinéticas de las interacciones entre las células y los derivados de DBTS a diferentes concentraciones. Las curvas del índice celular se normalizaron frente a los valores del índice celular en un punto temporal inmediatamente posterior a la adición del compuesto (aproximadamente 18-24 horas después de la siembra celular).

Ejemplo 23**Visión de conjunto de la supresión de la dinámica de microtúbulos por DBTS y sus compuestos derivados ACEA100108 y ACEA100116.**

Los microtúbulos son importantes en numerosos procesos celulares, incluida la mitosis cuando los cromosomas duplicados se separan en dos conjuntos idénticos antes de la escisión de la célula en dos células hijas. El papel clave de los microtúbulos y su dinámica en la mitosis y la división celular hacen de los microtúbulos una diana importante para los medicamentos contra el cáncer. En las células durante la interfase, los microtúbulos intercambian su tubulina por tubulina soluble en la reserva citoplásmica con tiempos medios de ~3 minutos a varias horas. Con el inicio de la mitosis, la red interfásica de microtúbulos se desensambla y es reemplazada por una población de microtúbulos altamente dinámicos que forma el huso mitótico y mueve los cromosomas. Los microtúbulos del huso mitótico son 20-50 veces más dinámicos que los microtúbulos en las células interfásicas, y algunos microtúbulos del huso intercambian su tubulina por tubulina en el grupo soluble con tiempos medios tan rápidos como 15 segundos.

La dinámica de los microtúbulos del huso mitótico es exquisitamente sensible a la modulación por parte de los reguladores y a la alteración por fármacos de activos microtúbulos. Los fármacos dirigidos a microtúbulos pueden alterar la polimerización y la dinámica de microtúbulos en una amplia variedad de formas. Los mecanismos de acción de tres compuestos de ACEA designados DBTS, ACEA100108 y ACEA100116 con respecto a (1) la capacidad de influir en la red de microtúbulos en células cultivadas, (2) la capacidad de influir en el ensamblaje de microtúbulos *in vitro* y (3) la capacidad para influir en la dinámica de los microtúbulos *in vitro*, se describen a continuación.

(DBTS y ACEA100116 no son parte de la invención).

Métodos

Cultivo celular e inmunocitoquímica. Se cultivaron células COS en medio DMEM con un suplemento de aminoácidos no esenciales, FBS al 10%, antibiótico-antimicótico (Gibco BRL) a 37°C y 5,5% de CO₂. Para la microscopía de

inmunofluorescencia, las células se sembraron en cubreobjetos recubiertos con polilisina y se trataron con diversas concentraciones de los tres compuestos de ACEA, paclitaxel o vinblastina durante 4 o 24 horas (véanse las cifras individuales para las concentraciones utilizadas en cualquier experimento dado). Después, las células se enjuagaron una vez con PBS caliente, se fijaron con metanol frío, se enjuagaron nuevamente en PBS y se bloquearon durante la noche a 4°C en PBT (PBS, BSA al 1%, Triton X-100 al 0,5%). Todas las tinciones y lavados posteriores se realizaron en PBT a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario. Las células se tiñeron con el anticuerpo de ratón anti-tubulina DM-1 a 1:1000 durante 1 hora, se lavaron cuatro veces durante 15 minutos cada una y a continuación se trataron con anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con Cy-3 a 1:100 durante 1 hora en la oscuridad. A continuación, las muestras se lavaron cuatro veces durante 15 minutos cada una en PBT en la oscuridad, seguido de un lavado final de 15 minutos en PBS en la oscuridad. Las muestras se observaron a continuación mediante microscopía confocal de barrido láser.

Ensayos de ensamblaje de microtúbulos. Las semillas de microtúbulos se sintetizaron incubando tubulina de cerebro bovino purificada con GTP 1 mM, glicerol al 10% y DMSO al 10% a 35°C durante 30 minutos, seguido de cizallamiento haciendo pasar los microtúbulos ensamblados 6 veces a través de una aguja de calibre 27. El ensamblaje de microtúbulos se analizó añadiendo 27,5 ul de semillas de microtúbulos a cubetas espectrofotométricas (mantenidas a 35°C) que contenían 247,5 ul de tubulina de cerebro bovino purificada en un tampón PEM-100 (PIPES 100 mM, pH = 6,8, EDTA 1 mM, MgSO₄ 1 mM) con un suplemento de GTP 1 mM (y fármaco cuando corresponda) y controlando la DO₄₀₀ durante 2 horas. Dado que los compuestos se disolvieron en DMSO y que el DMSO puede tener un efecto significativo sobre el conjunto de microtúbulos, se añadió DMSO a todas las cubetas para igualar el mayor volumen de fármaco añadido a las reacciones. Cabe señalar que la velocidad inicial de las reacciones del conjunto de microtúbulos es tan rápida que no siempre se puede detectar el aumento inicial en el perfil de dispersión de la luz porque se está produciendo mientras se preparan las muestras. Sin embargo, todas las muestras comienzan con la misma densidad óptica, ya que son idénticas a excepción del medicamento que se está introduciendo.

Análisis de dinámica de microtúbulos y purificación de tubulina. La tubulina se purificó, como se describe en la bibliografía ("Estabilización cinética de la inestabilidad dinámica de microtúbulos in vitro por vinblastina", Toso, R.J., Jordan, M.A., Farrell, K.W., Matsumoto, B. y Wilson, L., Biochemistry, 1993, 32, 1285-1293). Brevemente, se preparó la proteína de microtúbulos del cerebro bovino rica en proteínas asociada a microtúbulos mediante tres ciclos de ensamblaje y desensamblaje. La tubulina se purificó a partir de otras proteínas de microtúbulos mediante elución a través de una columna de fosfocelulosa Whatman P-11 equilibrada en PEM50 (PIPES 50 mM, MgSO₄ 1 mM, EGTA 1 mM, GTP 0,1 mM). La tubulina purificada (> 99% pura) se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C. La tubulina purificada (dímero de tubulina 15 µM) se polimerizó en los extremos de semillas axonémicas de erizo de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) a 37°C en presencia o ausencia de ACEA 01, 08 o 16 en tampón PMEM (PIPES 87 mM, MES 36 mM, MgCl₂ 1,4 mM), EDTA 1 mM, pH 6,8) y GTP 2 mM. La dinámica de los microtúbulos individuales se registró a 37°C utilizando videomicroscopía mejorada con contraste diferencial de interferencia. Los extremos se designaron como más o menos en función de la tasa de crecimiento, el número de microtúbulos que crecían en los extremos opuestos de las semillas y la longitud relativa de los microtúbulos (Panda, D., Goode, B.L., Feinstein, S.C. y Wilson, L., estabilización cinética de la dinámica de los microtúbulos en estado estacionario por tau y dominios de unión a microtúbulos de tau, Biochemistry, 1995, 34, 11117-11127; Walker, R.A., O'Brien, E.T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A., Erickson, H.P. y Salmon, E.D., Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies, J. Cell Biol. 1988, 107, 1437-1448). Los extremos más se analizaron durante 10 minutos mediante portaobjetos durante la fase de polimerización en estado estacionario (~45 minutos después del inicio de la polimerización). Los historiales de vida de los microtúbulos individuales se recolectaron según describe Panda *et al.* 1995 (Panda, D., Goode, B.L., Feinstein, S.C. y Wilson, L., Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau, Biochemistry, 1995, 34 11117-11127.) con modificaciones. Los puntos de datos se recolectaron a intervalos de 1-3 s.

Se consideró que un microtúbulo estaba creciendo o acortándose si aumentaba o disminuía su longitud a una velocidad >0,5 µm/min. Los microtúbulos que exhibían tasas de crecimiento de <0,5 µm/min durante un período superior a 30 s se consideraron en un estado atenuado. Las tasas, longitudes y duraciones promedio son promedios de eventos independientes. La frecuencia de catástrofe se calculó dividiendo el número de eventos de acortamiento por el tiempo total de crecimiento y la atenuación rastreada, y la frecuencia de rescate se calculó dividiendo el número de eventos de rescate por el tiempo total de acortamiento rastreado. Para controlar el error experimental, cada condición se filmó durante varios días utilizando al menos dos mezclas distintas de tubulina/GTP (2-3 portaobjetos cada una). No se observó variación importante en la dinámica de los microtúbulos entre las mezclas o portaobjetos de una condición dada. La concentración del fármaco utilizado en los análisis de inestabilidad dinámica se eligió observando inicialmente microtúbulos estabilizados con la mitad de la concentración utilizada en los ensayos de ensamblaje de microtúbulos. Si la mayoría de los microtúbulos en un portaobjetos fueran estables, la concentración del fármaco se reduciría hasta que cualquier microtúbulo determinado rastreado tuviera al menos dos eventos de crecimiento o acortamiento en el lapso de 10 minutos.

Las Figuras 28-38 muestran el efecto de los compuestos de DBTS y organosulfurados ACEA 100108 y ACEA 100116 en la red de microtúbulos en células cultivadas. La Figura 28 muestra imágenes de microtúbulos en células de control no expuestas a fármacos. Las redes de microtúbulos aparecen como se esperaba. La Figura 29 muestra imágenes de microtúbulos en células expuestas a taxol durante 4 horas. Los microtúbulos aparecen agrupados en algunas ubicaciones; con una concentración creciente, la agrupación aparece más extensa, pero los microtúbulos a menudo parecen más cortos que en las células de control. La Figura 30 muestra imágenes de microtúbulos en células expuestas a taxol durante 24 horas. Al aumentar la dosis, las anomalías de los microtúbulos aumentan. Como muestra esta figura, aumenta el agrupamiento y persisten los microtúbulos cortos. Además, se ponen de manifiesto las principales anomalías celulares.

La Figura 31 muestra imágenes de microtúbulos en células expuestas a vinblastina durante 4 horas. Al aumentar la dosificación, la red de microtúbulos comienza a desmoronarse y los microtúbulos se vuelven mucho más cortos. La Figura 32 muestra imágenes de microtúbulos en células expuestas a vinblastina durante 24 horas. Como muestra esta figura, las principales anomalías celulares están muy extendidas en la red de microtúbulos.

La Figura 33 muestra imágenes de microtúbulos en células expuestas a DBTS durante 4 horas. La red de microtúbulos está completamente interrumpida; solo existen microtúbulos muy cortos y el nivel general de tubulina en los microtúbulos parece reducirse significativamente. Este efecto podría cuantificarse bioquímicamente mediante extracción con detergente no iónico e inmunotransferencia. La Figura 34 muestra imágenes de microtúbulos en células expuestas a DBTS durante 24 horas. A la dosis más baja, hay algunos microtúbulos presentes y las células parecen haberse recuperado parcialmente en comparación con las células expuestas al fármaco durante solo 4 horas; ninguna célula es viable después del tratamiento durante 24 horas con 6 μM o 18 μM de DBTS.

La Figura 35 muestra imágenes de microtúbulos en células expuestas a ACEA100108 durante 4 horas. De manera similar a DBTS, la red de microtúbulos está marcadamente alterada a todas las concentraciones sometidas a ensayo. Los microtúbulos son muy cortos y el nivel general de contenido de microtúbulos parece ser reducido. A la concentración más alta, las células a menudo se redondean. La Figura 36 muestra imágenes de microtúbulos en células expuestas a ACEA100108 durante 24 horas. Tanto a 1 μM como a 3 μM , las células parecen haberse recuperado algo entre 4 y 24 horas. Las redes de microtúbulos en ambos casos parecen relativamente normales. Sin embargo, a 9 μM , los microtúbulos aparecen cortos y la red es anormal.

La Figura 37 muestra imágenes de microtúbulos en células expuestas a ACEA100116 durante 4 horas. Los restos de la red de microtúbulos permanecen a 1 μM , pero a las dos concentraciones más altas, los microtúbulos aparecen muy cortos y anormales. Las células no son alargadas, sino que parecen redondearse de una manera dependiente de la dosis. La Figura 38 muestra imágenes de microtúbulos en células expuestas a ACEA100116 durante 24 horas. Las células tratadas solo con ACEA100116 1 μM parecen relativamente normales; esencialmente, todas las células tratadas con 3 μM o 9 μM murieron después de 24 horas de exposición a ACEA100116.

Las Figuras 39-41 muestran el efecto de los compuestos DBTS y organosulfurados ACEA 100108 y ACEA 100116 en el ensamblaje de microtúbulos *in vitro*. Como se muestra en la Figura 39a, todas las dosis de DBTS inhiben significativamente la magnitud del ensamblaje de microtúbulos. El efecto es especialmente prominente a 9 μM . La estructura de microtúbulos de las muestras tanto de control (Figura 39b) como tratadas con fármaco (Figura 39c) se visualizaron mediante microscopía electrónica. Como se muestra en la Figura 40, las dosis más bajas de ACEA100108 tuvieron efectos mínimos sobre el conjunto de microtúbulos. Por el contrario, ACEA100108 27 μM tuvo un marcado efecto inhibitorio sobre la magnitud del ensamblaje de microtúbulos.

Como se muestra en la Figura 41, ACEA100116 es muy diferente que DBTS y ACEA100108. Mientras que los otros dos fármacos inhiben el ensamblaje de los microtúbulos, ACEA100116 promueve el ensamblaje de los microtúbulos. Esto es evidente tanto a 9 μM como a 27 μM . Este diagrama también muestra un fenómeno común, pero no bien entendido, conocido como sobredisparo "overshooting" en donde el patrón de dispersión de la luz no se estabiliza sino que disminuye constantemente. No obstante, está claro que ACEA100116 promueve en lugar de inhibir el ensamblaje de microtúbulos *in vitro*.

Además, se demostró que DBTS, ACEA 100108 y ACEA 100116 influyen en el comportamiento de los microtúbulos *in vitro*. Como se observa en la Tabla 37, los tres fármacos alteraron el patrón de la dinámica de los microtúbulos. El DBTS no afectó la tasa de crecimiento de los microtúbulos, pero aumentó la duración promedio de los eventos de crecimiento y, en consecuencia, la longitud promedio crecida en un evento de crecimiento. También aumentó el porcentaje de tiempo dedicado al crecimiento. La duración promedio de los eventos de acortamiento también se redujo.

ACEA100108 también aumentó la duración de los eventos de crecimiento y la duración promedio de los eventos de crecimiento; también tuvo un fuerte efecto sobre la duración de los eventos de acortamiento; este efecto fue aún más pronunciado que el de DBTS y ACEA100116 exhibió efectos significativamente diferentes que cualquiera de los otros dos fármacos. ACEA100116 aumentó la tasa de crecimiento pero tuvo poco efecto sobre la duración de los

eventos de crecimiento. No tuvo ningún efecto sobre la tasa de acortamiento, pero tuvo un fuerte efecto sobre la duración de los eventos de acortamiento. Si bien los datos de imágenes celulares no pueden distinguir entre los fármacos que se unen a las proteínas asociadas a tubulina o microtúbulos, el ensamblaje de microtúbulos in vitro y los ensayos de dinámica de microtúbulos in vitro utilizaron solo tubulina purificada sin MAP. Estas observaciones demuestran que los tres fármacos interactúan directamente con tubulina.

5

Tabla 37.

DBTS y sus compuestos derivados ACEA100108 y ACEA100116 suprimen la dinámica de los microtúbulos.				
	Control de tubulina solo	DBTS .1uM	ACEA100108 .2uM	ACEA 100116 .07uM
Velocidad de Crecimiento ± ETM (um/min)	1,44 ± 0,1	1,55 ± 0,1	1,59 ± 0,1	1,79* ± 0,1
Duración de la excursión (um)	2,34 ± 0,2	3,34 ± 0,3*	3,24 ± 0,3*	2,15 ± 0,2
Duración del evento (min)	1,63 ± 0,2	2,21 ± 0,3	2,04 ± 0,3	1,2 ± 0,2
% tiempo pasado en fase de crecimiento	31	45	30	25
Velocidad de Acortamiento ± ETM (um/min)	44,90 ± 12,6	35,40 ± 6,0	35,8 ± 4,3	42,0 ± 8,3
Duración de la excursión (um)	10,54 ± 0,5	6,02 ± 0,3*	3,79 ± 0,3*	4,55 ± 0,2*
Duración del evento (min)	0,23 ± 0,06	0,17 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02
% de tiempo pasado en la fase de acortamiento	3	3	1	2
% de tiempo pasado en la fase de atenuación	66	52	69	73
Duración media de la atenuación ± SEM	2,63 ± 0,3	2,15 ± 0,3	3,74 ± 0,7	2,22 ± 0,2
Frecuencia de transiciones ± DT (eventos/min)				
Catástrofes	0,12 ± 0,03	0,17 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,18 ± 0,04
Rescates	4,3 ± 1,1	5,3 ± 1,3	9,4 ± 3,0	8,7 ± 2,1
Total	0,46 ± 0,06	0,50 ± 0,07	0,32 ± 0,06	0,61 ± 0,08
Dinámica (um/min)	1,73	1,72	0,83	1,25
A partir del 3/31/2005 * = p < 0,05 o menos				

Ejemplo 24

10

ACEA100108 induce la apoptosis en células cancerosas

15

20

25

Para evaluar si el compuesto ACEA100108 induce apoptosis en células cancerosas, las células de cáncer de pulmón humano A549 se trataron con ACEA100108 1 µM y paclitaxel 50 nM o vinblastina 10 nM. Se utilizaron paclitaxel y vinblastina, los dos supresores de la dinámica de los microtúbulos como control positivo. Las células A549 se sembraron en portaobjetos con cámara a una densidad de 10.000 células/pocillo y 18 horas más tarde se trataron con las concentraciones indicadas de los compuestos antimetabólicos ACEA100108, paclitaxel y vinblastina. Las células se incubaron con los fármacos durante 24 horas y a continuación se lavaron 2X con PBS y 3X con tampón de unión (HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM). Las células se tiñeron con 1µg/ml de producto conjugado de Anexina V-Cy3 (Rojo, tiñendo las células que están comenzando el proceso apoptótico) y 6-CFDA 500 uM (verde, tiñendo las células viables) en tampón de unión 1X durante 20 minutos. Las células se lavaron cuidadosamente 3 veces en tampón de unión 1X, se montaron, se observaron con un microscopio de inmunofluorescencia y se obtuvieron imágenes utilizando una cámara CCD fijada. Obsérvese que las células vivas muestran tinción solo con 6-CFDA (verde), mientras que las células necróticas se tiñen solo con Anexina V-Cy3 (rojo). Las células que comienzan el proceso apoptótico se teñirán con Anexina V-Cy3 y 6-CFDA.

Como se muestra en la Figura 42, las células tratadas con ACEA100108, paclitaxel y vinblastina mostraron una fuerte tinción de Anexina V, mientras que las células de control que solo se trataron con DMSO no mostraron tinción de Anexina V. Esto indica que ACEA100108 induce la apoptosis en células de cáncer de pulmón humano A549.

5 Ejemplo 25

ACEA100108 induce la detención del ciclo celular en G2/M en células cancerosas

Los microtúbulos son extremadamente importantes en el proceso de mitosis, durante el cual los cromosomas duplicados de una célula se separan en dos conjuntos idénticos antes de la escisión de la célula en dos células hijas. Los compuestos que se dirigen a los microtúbulos tales como paclitaxel y vinblastina suprimen la dinámica de los microtúbulos y bloquean el proceso de mitosis. Como consecuencia, las células serán detenidas en la fase G2/M. Para evaluar si ACEA100108 influye en el proceso de mitosis en células cancerosas en división, se trataron células de cáncer de pulmón humano A549 con ACEA100108 25 μ M y paclitaxel 7,8 nM, y los efectos del ciclo celular de los compuestos se detectaron mediante citometría de flujo.

Brevemente, las células A549 se sembraron a una densidad de 500.000 células en placas de cultivo de tejidos de 60 mm. Aproximadamente 18 horas después, las células se trataron con las concentraciones indicadas de compuestos antimitóticos y se dejaron incubando durante 24 horas. Las células se lavaron en PBS, se tripsinizaron, se contaron y se fijaron en metanol del 70% enfriado en hielo y se almacenaron a 4°C. Las células se lavaron con PBS, se tiñeron con yoduro de propidio y se mantuvieron en hielo hasta el análisis de citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 43, la población celular en la fase G2/M aumentó significativamente en las células tratadas tanto con ACEA100108 como con paclitaxel, en comparación con las células tratadas solo con DMSO.

25 Ejemplo 26 (No forma parte de la invención)

Síntesis a gran escala de trisulfuro de di(p-clorobencilo) (9)

Se disolvió *N*-trimetilsililimidazol (10,67 mL, 97%, $d = 0,956$, peso real = 9,89 g, 70,54 mmoles) en 70 mL de hexanos anhidros en un matraz seco de fondo redondo de 250 mL. A esta solución agitada se le añadió lentamente (40-50 min) solución de dicloruro de azufre en diclorometano (35,3 mL, 1,0 M, 35,3 mmoles) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Se formó un precipitado de color blanco. La mezcla de reacción se agitó durante 50 minutos, y a continuación se enfrió a 0°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió una solución de 4-clorobencilmercaptano (9,5 mL, 96%, peso real = 11,19 g, 70,53 mmoles) en 50 mL de hexanos anhidros gota a gota con agitación y atmósfera de nitrógeno durante 40-50 minutos. La mezcla de reacción resultante se agitó a 0°C durante 1 hora, y a continuación a temperatura ambiente durante 3 horas. El sólido de color blanco a amarillo pálido se separó por filtración a través de un lecho de Celite y se lavó con una pequeña cantidad de hexanos. El filtrado se lavó con agua (200 mL, 100 mL) y a continuación con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (200 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente de secado se separó por filtración, y el filtrado se concentró a presión reducida.

El residuo sólido de color blanco se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice utilizando hexanos-acetato de etilo (60:1) como eluyente. Las fracciones se controlaron con TLC de gel de sílice utilizando hexanos - acetato de etilo (40:1) como disolvente de desarrollo ($R_f = 0,45$). Las fracciones deseadas se recogieron y el disolvente se evaporó. El producto sólido de color blanco resultante se recrystalizó en hexanos para proporcionar 11,06 g (90%) del producto deseado 9 en forma de agujas cristalinas de color blanco. RMN 1H (499,1 MHz, $CDCl_3$) δ 3,98 (s, 4H), 7,23 (d, 4H, $J = 8,4$ Hz), 7,30 (d, 4H, $J = 8,4$ Hz); ES MS m/z 345 (M-1).

50 Ejemplo 27

Síntesis a gran escala de trisulfuro de di(p-fluorobencilo) (8)

NORTE-Se disolvió trimetilsililimidazol (21,42 mL, 97%, $d = 0,956$, peso real = 19,86 g, 141,6 mmoles) en 140 mL de hexanos anhidros en un matraz seco de fondo redondo de 500 mL. A esta solución agitada se añadió lentamente (40-50 min) solución de dicloruro de azufre en diclorometano (70,8 mL, 1,0 M, 70,8 mmoles) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. El precipitado blanco se formó. La mezcla de reacción se agitó durante 50 minutos, y a continuación se enfrió a 0°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota una solución de 4-fluorobencilmercaptano (18,04 mL, 20,86 g, 96%, peso real = 20,0 g, 140,8 mmoles) en 100 mL de hexanos anhidros bajo agitación y atmósfera de nitrógeno durante 40-50 minutos. La mezcla de reacción resultante se agitó a 0°C durante 1 hora, y a continuación a temperatura ambiente durante 3 horas. El sólido de color blanco a amarillo pálido se separó por filtración a través de un lecho de Celite y se lavó con una pequeña cantidad de hexanos. El filtrado se lavó con agua (400 mL, 300 mL) y a continuación con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (400 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente de secado se separó por filtración, y el producto filtrado se concentró a presión reducida.

El residuo sólido de color blanco se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice utilizando hexanos-acetato de etilo (60:1) como eluyente. Las fracciones se controlaron con TLC en gel de sílice utilizando hexanos-acetato de etilo (40:1) como disolvente de desarrollo ($R_f = 0,46$). Las fracciones deseadas se recogieron y el disolvente se evaporó. El producto sólido blanco resultante se recrystalizó en hexanos para proporcionar 14,7 g (67%) del producto deseado en forma de aguja blanca cristalina. El licor madre se concentró. La recrystalización adicional proporcionó 10-15% más de producto cristalino. p. f. 61,5-62,1°C; UV-VIS $\lambda = 218$ nm (ω , 63700), $\lambda = 283$ nm (ω , 12000); RMN H^1 (499,1 MHz, $CDCl_3$) δ 4,00 (s, 4 H), 7,01 (t, 4 H, $J = 8,8$ Hz), 7,27 (dd, 4H, $J = 8,8, 5,4$ Hz); RMN C^{13} (125,7 MHz, $CDCl_3$) δ 42,4, 115,6, 115,8, 131,2, 131,3, 132,4, 162,5 (C-F, $J = 250$ Hz); RMN F^{19} (376,5 MHz, $CDCl_3$) δ -114,2; ES MS m/z 337/338 (M + Na) $^+$; *Anal. Calc.* para $C_{14}H_{12}F_2S_3$: C, 53,48; H, 3,85; S, 30,59. Encontrado: C, 53,16; H, 4,22; S, 30,24.

Ejemplo 28

Síntesis a gran escala de trisulfuro de di(*p*-fluorobencilo) (8) utilizando dicloruro de azufre puro

Se disolvió *N*-trimetilsilimidazol (226,6 mL, 97%, $d = 0,956$, peso real = 205,7 g, 1467 mmoles) en 1200 mL de hexano anhidro y 560 mL de diclorometano anhidro (secado con tamices moleculares tipo 3A) en un matraz de 3 bocas seco de 3000 mL. A esta solución agitada se le añadió lentamente (40-50 min) dicloruro de azufre puro (55,9 mL, 90,63 g, 880 mmoles, 0,6 eq) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. La reacción tuvo lugar inmediatamente con precipitado. La mezcla de reacción se agitó durante 50 minutos, y a continuación se enfrió a 0°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota una solución de 4-fluorobencilmercaptano (176 mL, 96%, peso real = 200,17 g, 1408 mmoles) en 250 mL de diclorometano anhidro y 100 mL de hexano anhidro bajo agitación y atmósfera de nitrógeno durante 40-50 minutos. La mezcla de reacción resultante se agitó a 0°C durante 1 hora, y a continuación a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se controló con TLC utilizando hexano-acetato de etilo (40:1) como disolvente de desarrollo, y el resultado indicó que la reacción era normal y completa. El sólido de color blanco a amarillo pálido se separó por filtración a través de un lecho de Celite y se lavó con una pequeña cantidad de hexano. El producto filtrado se lavó dos veces con agua (1000 mL x 2) y a continuación una vez con solución acuosa saturada de cloruro de sodio (1000 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente de secado se separó por filtración, y el producto filtrado se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice (8 x 36 cm) utilizando éter de petróleo (fracción 60-90°C)-acetato de etilo (80:1, 60:1, 40:1 y a continuación 20:1) como eluyentes de gradiente. Las fracciones se controlaron con TLC de gel de sílice utilizando *n*-hexano-acetato de etilo (40:1) como disolvente de desarrollo ($R_f = 0,46$). Las fracciones deseadas se recogieron y el disolvente se evaporó. El producto sólido de color blanco resultante se recrystalizó a partir de 1000 mL de hexano para proporcionar 131,0 g del producto deseado **8** en forma de agujas cristalinas de color blanco con un rendimiento del 59,2% (rendimiento T 221,16 g). p. f. 61,5-62,1°C; UV-VIS $\lambda = 218$ nm (ω , 63700), $\lambda = 283$ nm (ω , 12000); RMN H^1 (499,1 MHz, $CDCl_3$) δ 4,00 (s, 4H), 7,01 (t, 4H, $J = 8,8$ Hz), 7,27 (dd, 4H, $J = 8,8, 5,4$ Hz); RMN C^{13} (125,7 MHz, $CDCl_3$) δ 42,4, 115,6, 115,8, 131,2, 131,3, 132,4, 162,5 (C-F, $J = 250$ Hz); RMN F^{19} (376,5 MHz, $CDCl_3$) δ -114,2; ES MS m/z 337/338 (M + Na) $^+$; *Anal. Calc.* para $C_{14}H_{12}F_2S_3$: C, 53,48; H, 3,85; S, 30,59. Encontrado: C, 53,16; H, 4,22; S, 30,24.

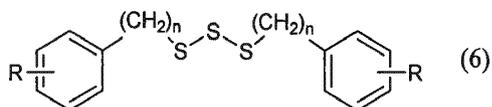
Los trisulfuros asimétricos **41-68** (Esquema 3) se pueden sintetizar por medio del Método B de una manera similar al procedimiento referido (Derbesy, G.; Harpp, D. N. Tetrahedron Letters, 1994, 35, 5381-5384). Por ejemplo, se añade gota a gota una solución de feniltiol ($C_6H_5CH_2SH$) (10 mmoles) y piridina anhidra (10 mmoles) en 25 mL de éter dietílico durante un período de 30 minutos a una solución agitada fría (-78°C) de dicloruro de azufre (10 mmoles) en 50 mL de éter dietílico anhidro. La mezcla de reacción se agita durante 30 minutos. Se añaden gota a gota el segundo tiol correspondiente (10 mmoles) y piridina anhidra (10 mmoles) en 25 mL de éter dietílico durante un período de 30 minutos a -78°C, y la mezcla de reacción se agita nuevamente durante 30 minutos adicionales. La mezcla de reacción se lava con agua (2 veces), una solución de hidróxido de sodio 1 N (2 veces) y a continuación agua (2 veces) hasta que el pH es neutro. La fase orgánica se seca sobre $CaCl_2$ o sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra. El residuo se pasa a través de un lecho corto de gel de sílice utilizando hexanos-acetato de etilo como eluyente para proporcionar productos de alta pureza **41-68** con rendimientos de 40-100%.

Se entiende que la descripción detallada anterior y los ejemplos que la acompañan, que también incluyen ejemplos no cubiertos por las reivindicaciones adjuntas, son meramente ilustrativos, y están limitados por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Varios cambios y modificaciones en las realizaciones descritas, aún cubiertas por el alcance de las reivindicaciones, serán evidentes para los expertos en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es:

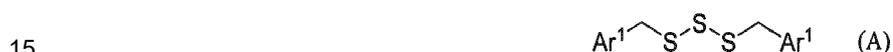
5 (a) un compuesto de fórmula (6):



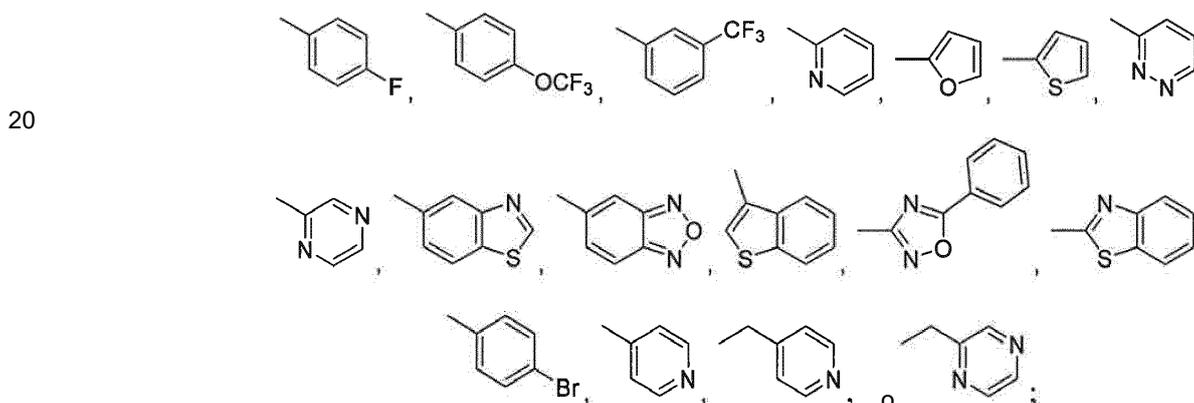
en donde cada n es 1-3; y

10 cada R es F, I, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, pentilo, hexilo o alquilo halogenado, refiriéndose alquilo a grupos hidrocarbonados saturados en una configuración lineal, ramificada o cíclica;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o
(b) un compuesto trisulfuro simétrico de fórmula A:



en donde cada Ar^1 es:



25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto es trisulfuro de di(fluorobencilo) o trisulfuro de di(trifluorometilbencilo), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto es trisulfuro de di(p-fluorobencilo) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento, en un ser humano, de un trastorno proliferativo celular seleccionado entre cáncer y reestenosis.

35 5. El compuesto para el uso de la reivindicación 4, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, linfoma, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer del SNC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de próstata, fibrosarcoma, hepatosarcoma, cáncer epidermoide, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de páncreas.

40 6. El compuesto para el uso de la reivindicación 4, en donde la reestenosis en dicho ser humano se mejora o se trata.

45 7. El compuesto para el uso de la reivindicación 6, en donde dicha reestenosis está asociada con la hiperplasia de la neoíntima.

8. El compuesto para el uso de la reivindicación 6, en donde éste se administra por vía oral o parenteral, o se administra por medio de un estent.

50 9. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde se reduce o se inhibe la proliferación celular, o se induce la muerte celular de una célula cancerosa.

10. El compuesto para el uso de la reivindicación 9, en donde se induce la apoptosis celular.
11. El compuesto para el uso de la reivindicación 9, en donde se rompe el ensamblaje o desensamblaje de tubulina, o se inhibe la progresión G2/M del ciclo celular, la mitosis celular, la proliferación de células endoteliales, la angiogénesis o una de sus combinaciones.
12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 1 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. Un método para preparar un compuesto de la reivindicación 1, que comprende:
- a) poner en contacto N-trimetilsilil imidazol con dicloruro de azufre en un disolvente halogenado para proporcionar sulfuro de diimidazolilo; y
 - b) poner en contacto dicho sulfuro de diimidazolilo con mercaptano.
14. Un método para preparar una composición que comprende un compuesto de la reivindicación 1, que comprende:
- a) disolver un compuesto de la reivindicación 1 en un disolvente orgánico soluble en agua, un disolvente no iónico, un lípido soluble en agua, una ciclodextrina, una vitamina, un ácido graso, un éster de ácido graso, un fosfolípido o una combinación de los mismos, para proporcionar una solución; y
 - b) añadir solución salina o un tampón que contiene solución de carbohidratos al 1 - 10%.
15. El método de la reivindicación 14, en donde dicho disolvente orgánico es polietilenglicol (PEG), un alcohol, N-metil-2-pirrolidona, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido o una combinación de los mismos.
16. El método de la reivindicación 14, en donde dicho tensioactivo no iónico es tricinoleato de polioxietilenglicerol 35, PEG-succinato, polisorbato 20, polisorbato 80, 12-hidroxiestearato de polietilenglicol 660, monooleato de sorbitán, poloxámero, aceite pérsico etoxilado, macrogol-8-glicérido de caprilo-caproilo, éster de glicerol, glicérido caprílico PEG 6, glicerina, glicopolisorbato o una combinación de los mismos.
17. El método de la reivindicación 14, donde dicho lípido es aceite de ricino, aceite de ricino polioxílico, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de menta, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de soja, aceite vegetal hidrogenado, aceite de soja hidrogenado, triglicérido de aceite de coco, aceite de semilla de palma y formas hidrogenadas de los mismos, o una combinación de los mismos.
18. El método de la reivindicación 14, en donde dicha vitamina es tocoferol.
19. El método de la reivindicación 14, en donde dicho éster de ácido graso es un monoglicérido, diglicérido, un mono- o diéster de ácido graso de PEG, o una combinación de los mismos.
20. El método de la reivindicación 14, en donde dicha ciclodextrina es alfa-ciclodextrina, beta-ciclodextrina, hidroxipropil-beta-ciclodextrina o sulfobutil éter-beta-ciclodextrina.
21. El método de la reivindicación 14, en donde dicho fosfolípido es fosfatidilcolina de soja, o diestearoil fosfatidilglicerol, y formas hidrogenadas de los mismos, o una combinación de los mismos.
22. El método de la reivindicación 14, en donde dicho carbohidrato comprende dextrosa.
23. Una composición preparada de acuerdo con el método de la reivindicación 14.

Figura 1A

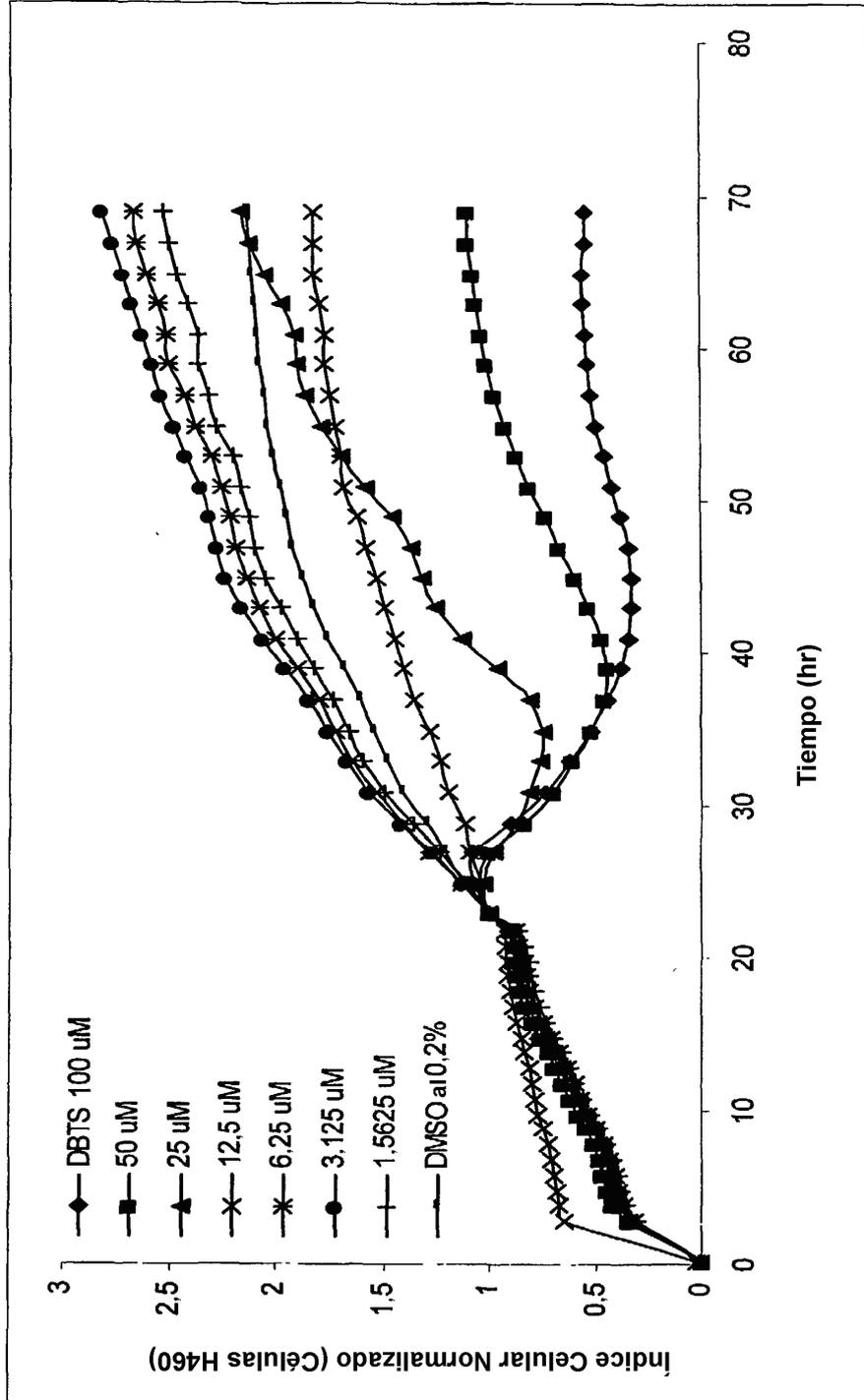


Figura 1B

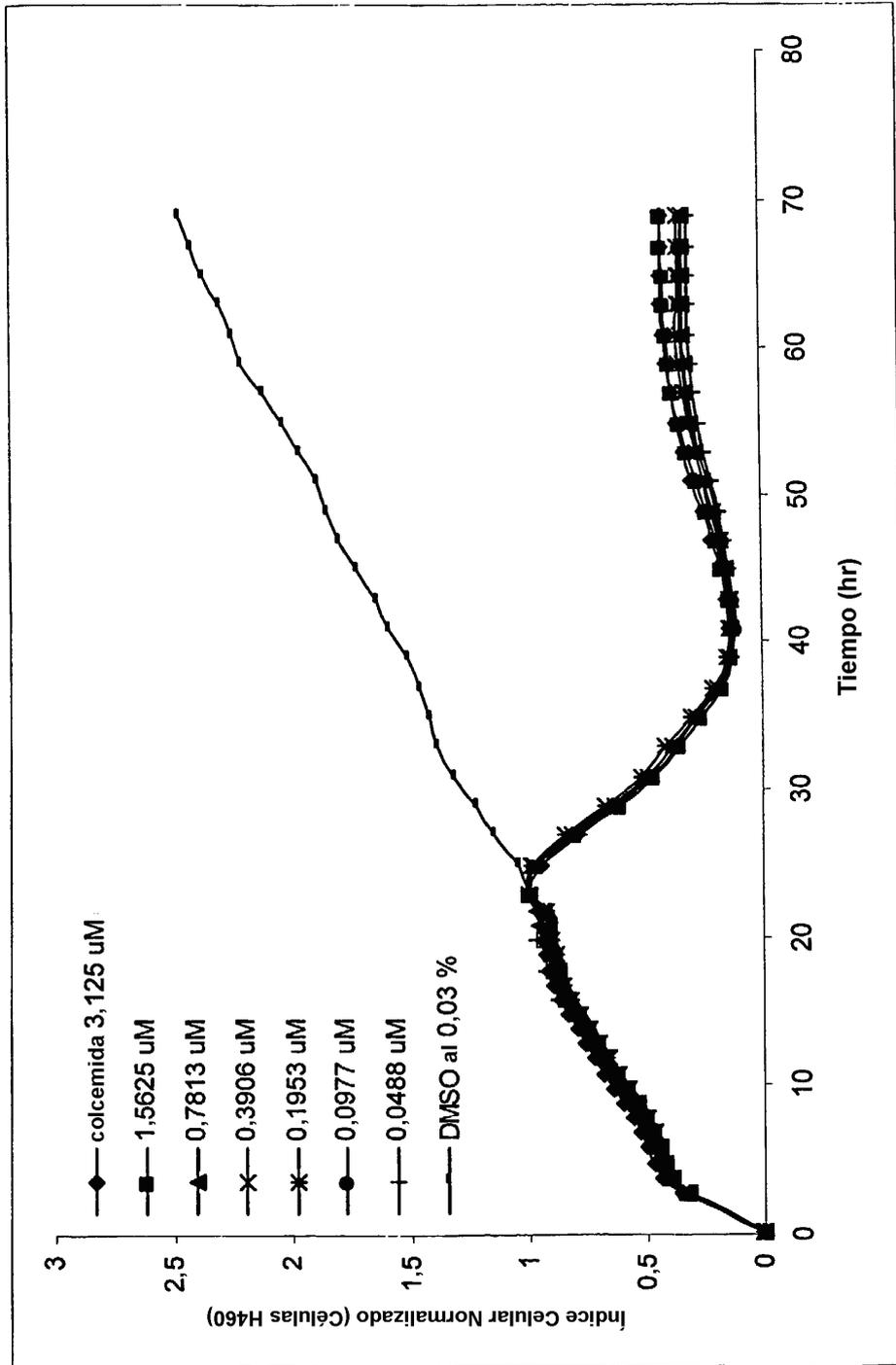


Figura 1C

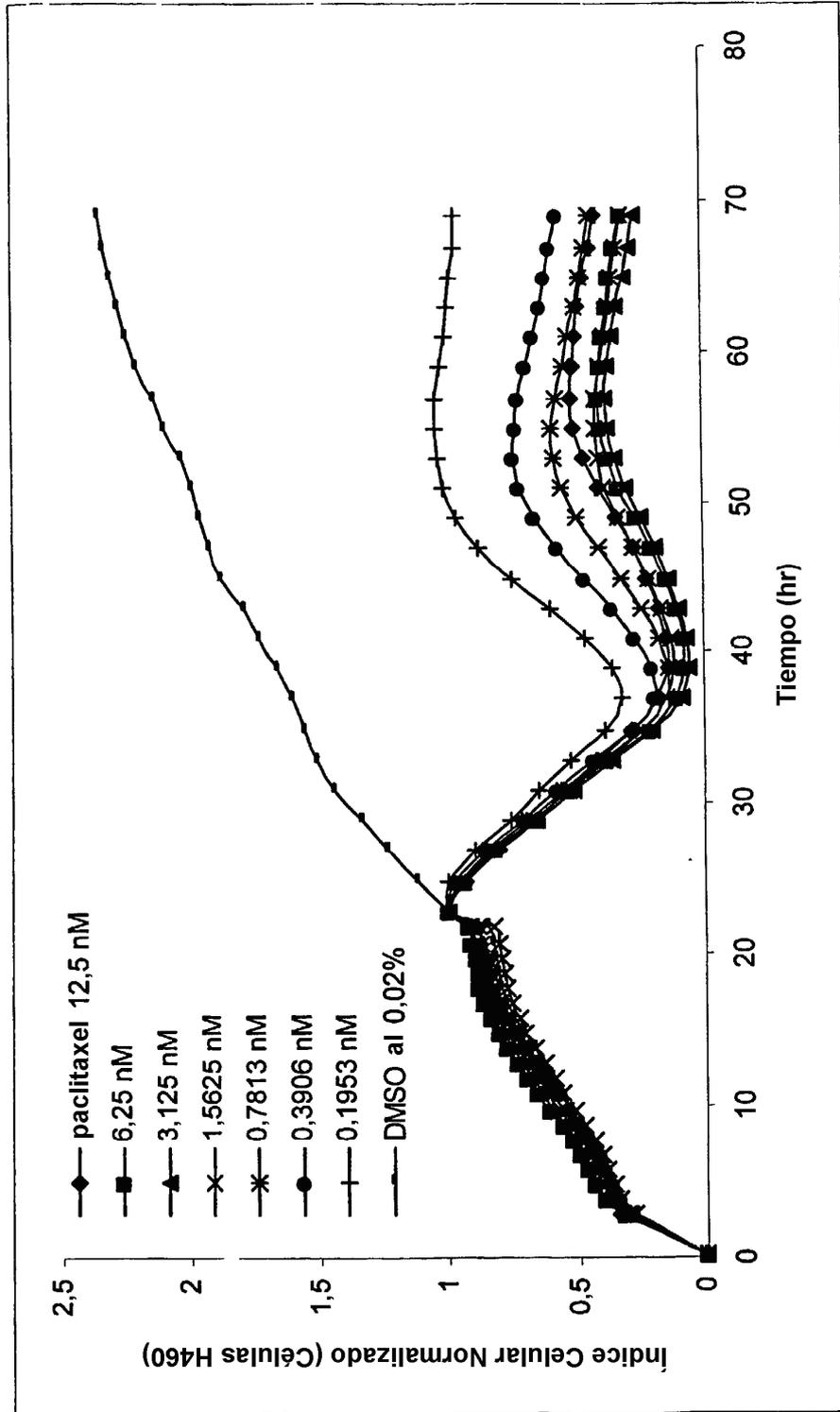


Figura 2

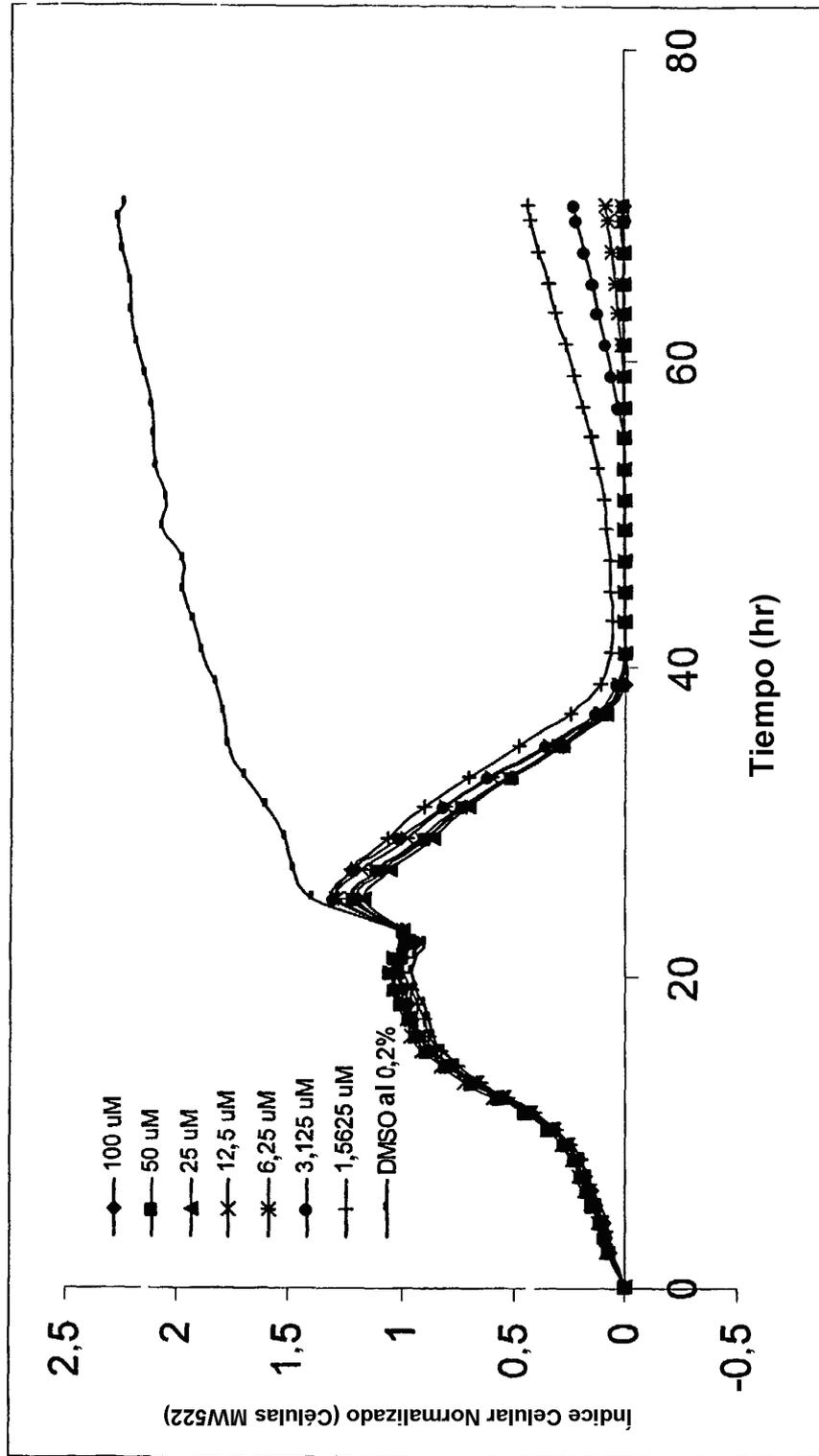


Figura 3

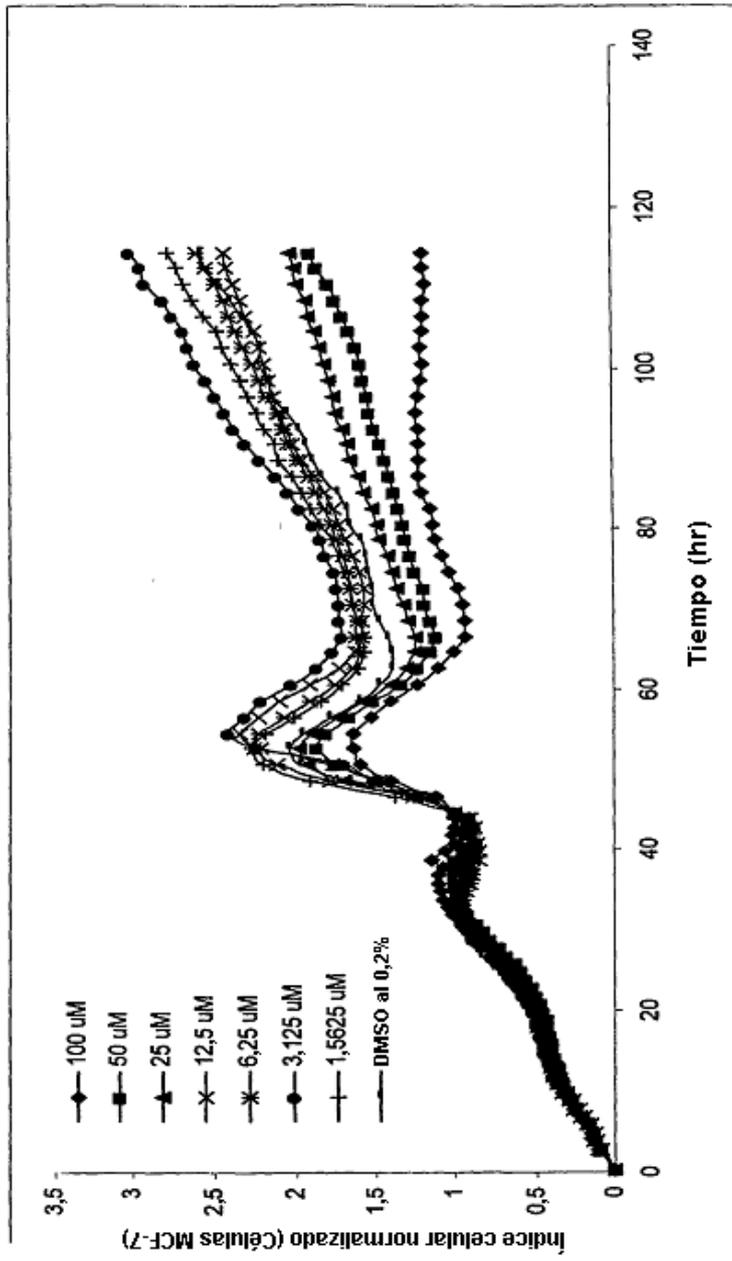


Figura 4

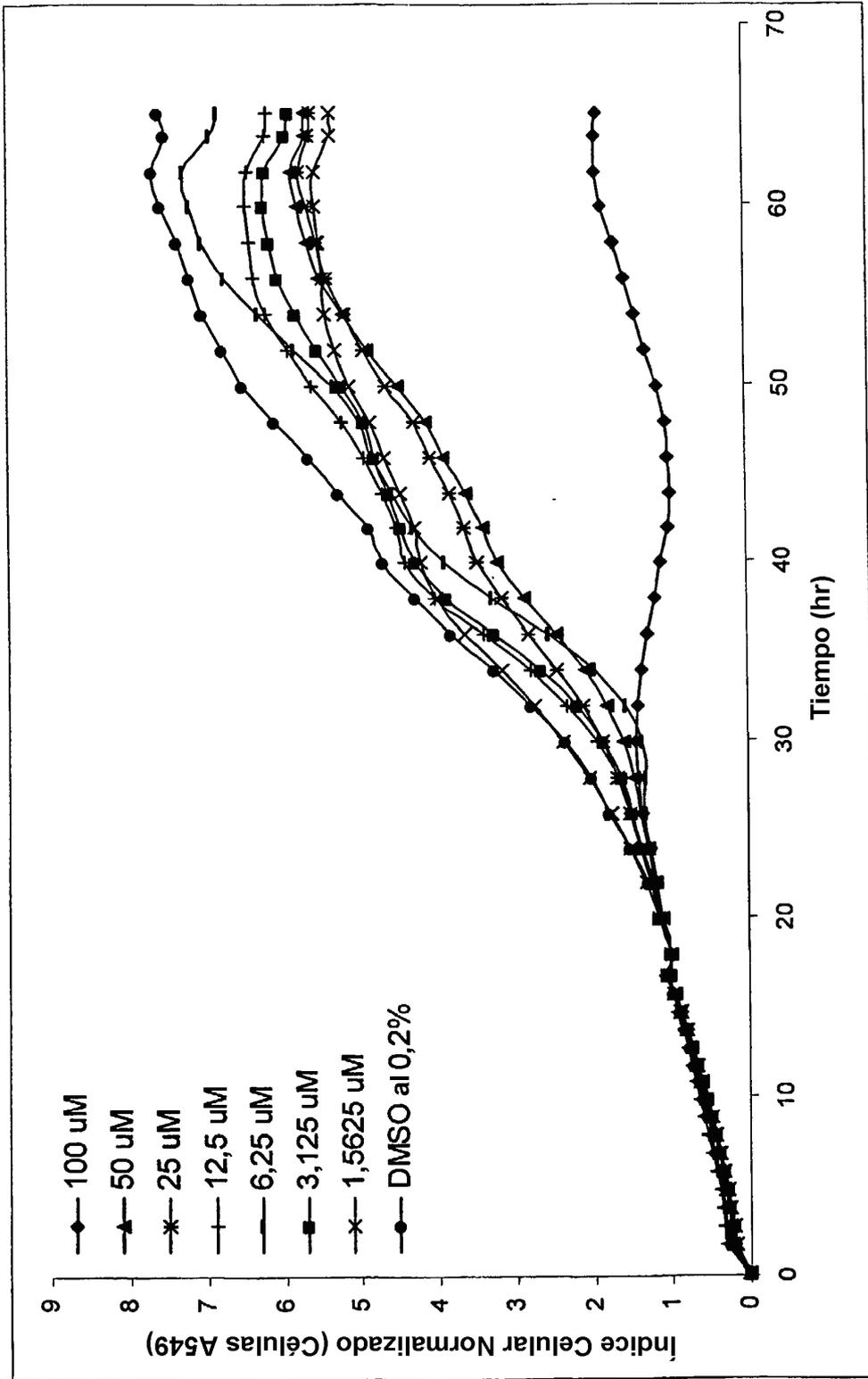


Figura 5

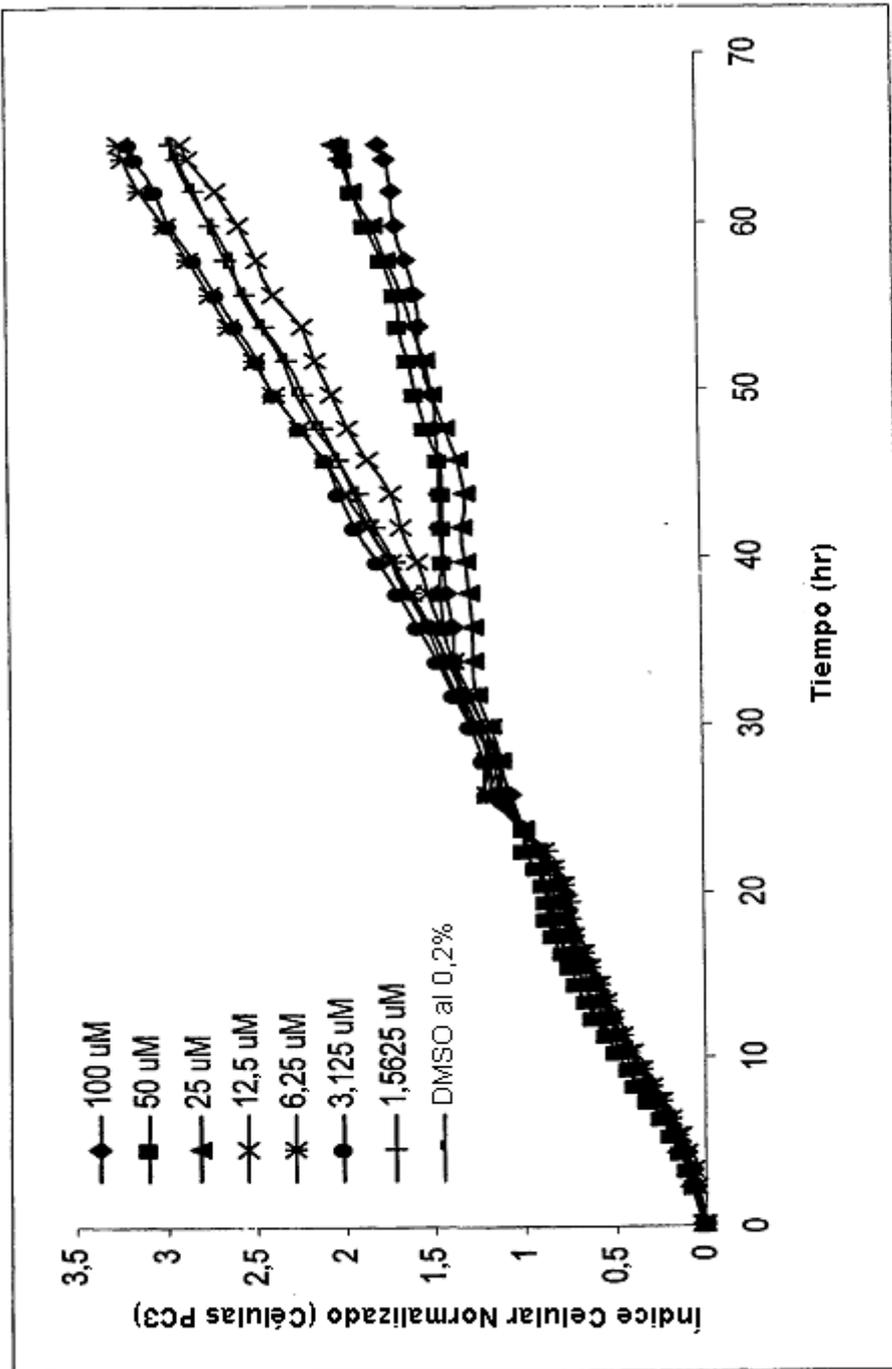


Figura 6A

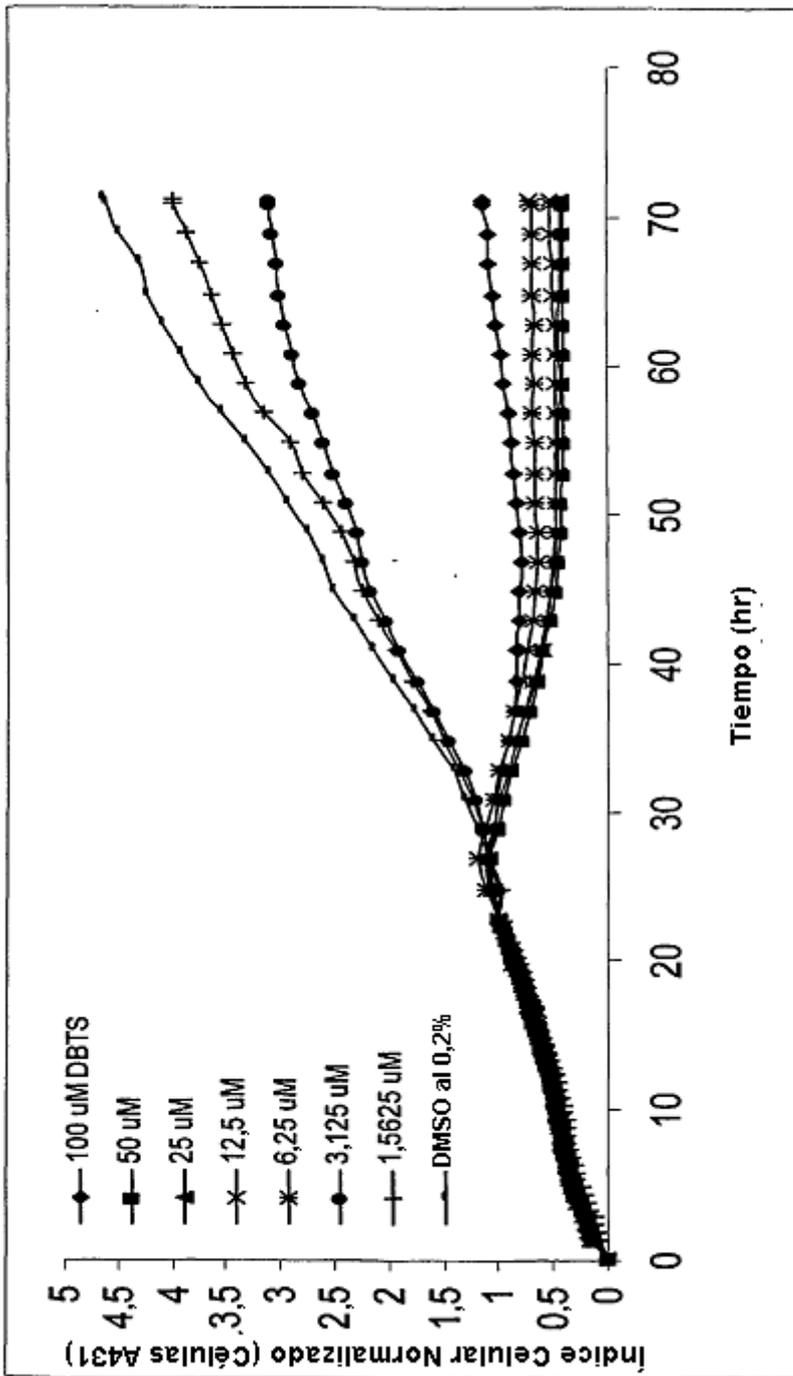


Figura 6B

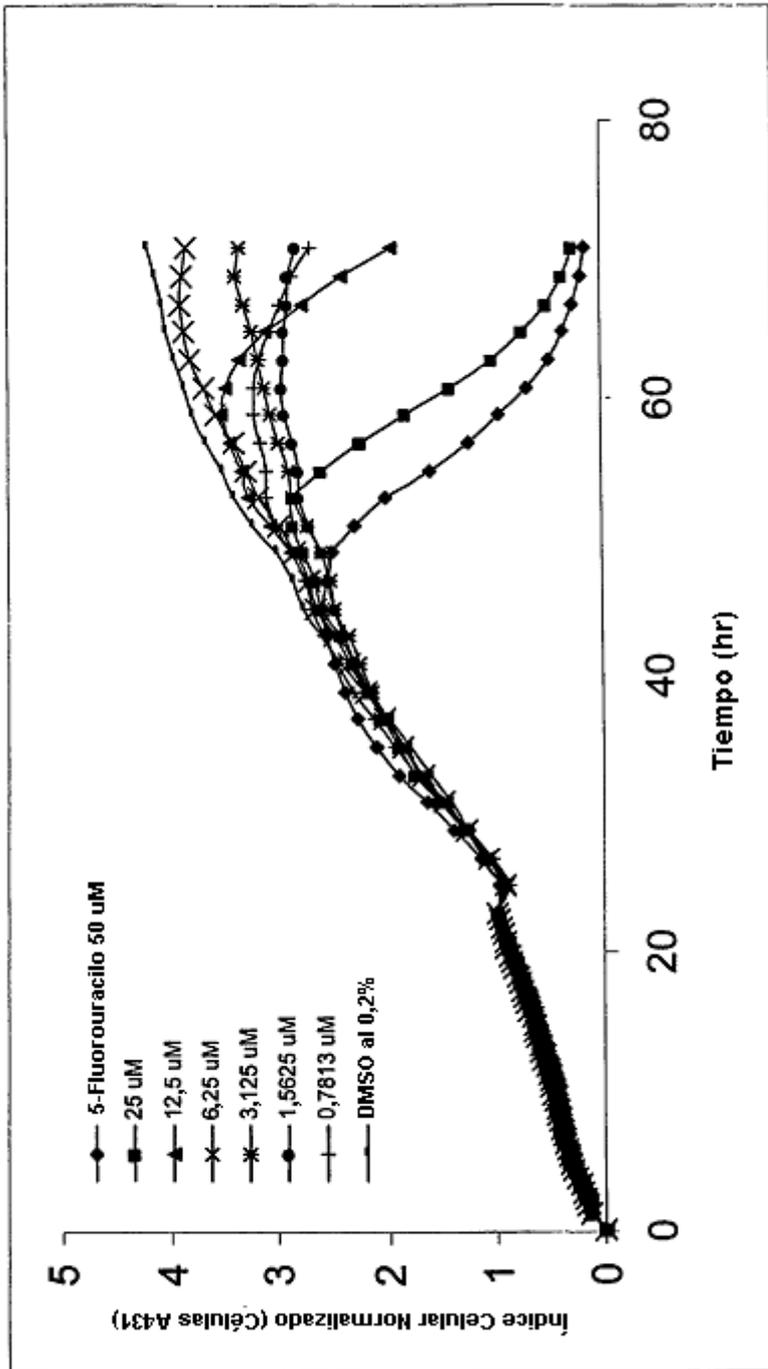


Figura 7

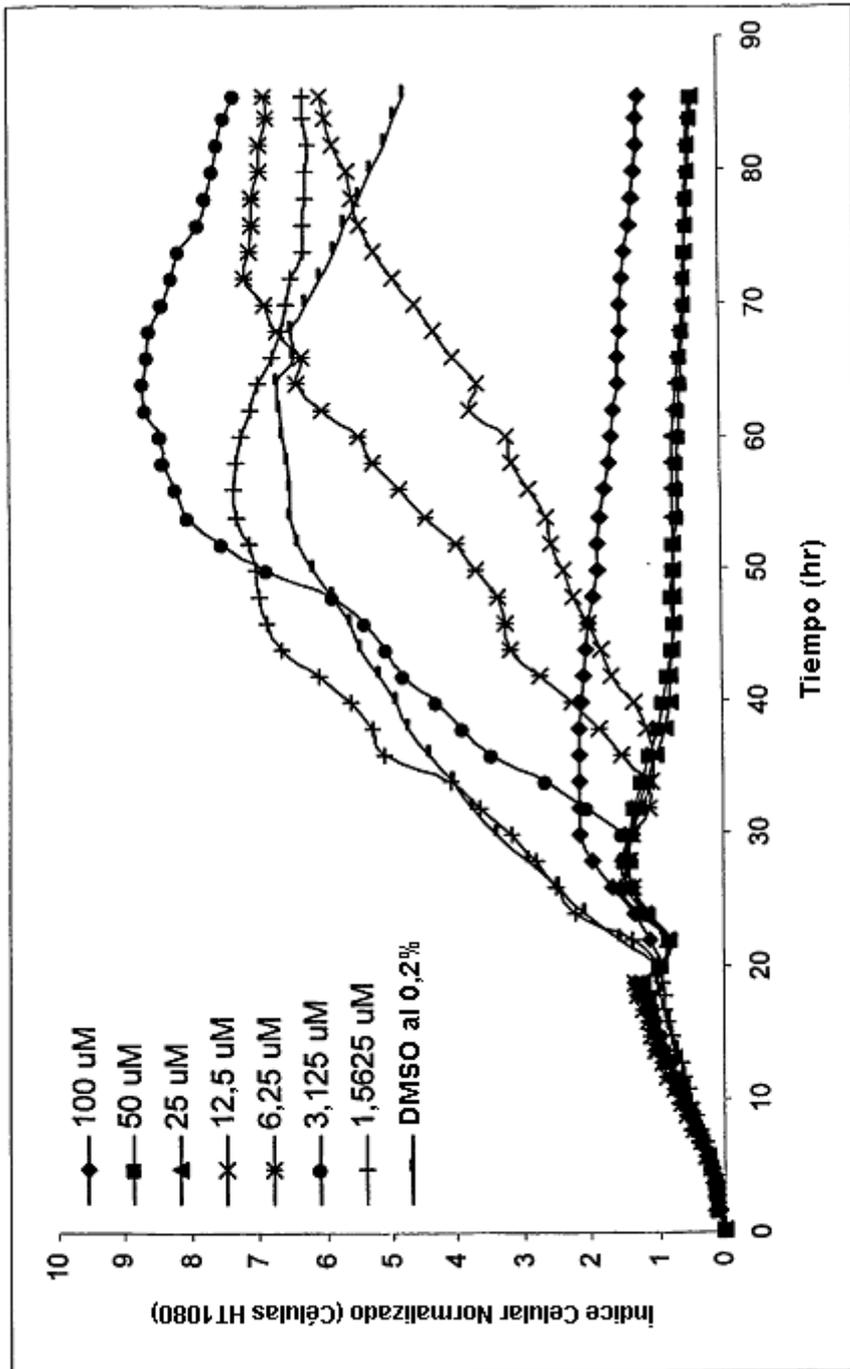


Figura 8

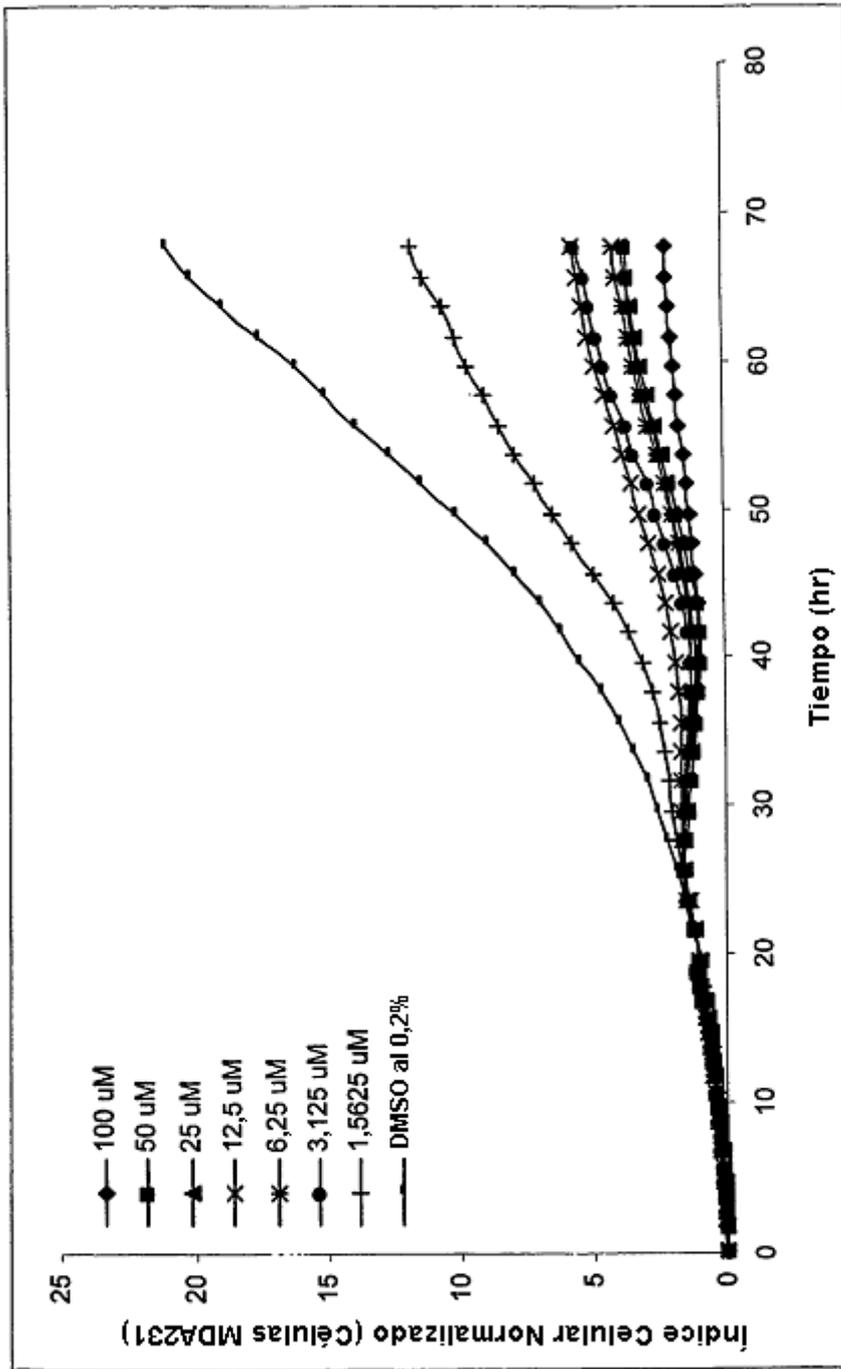


Figura 9

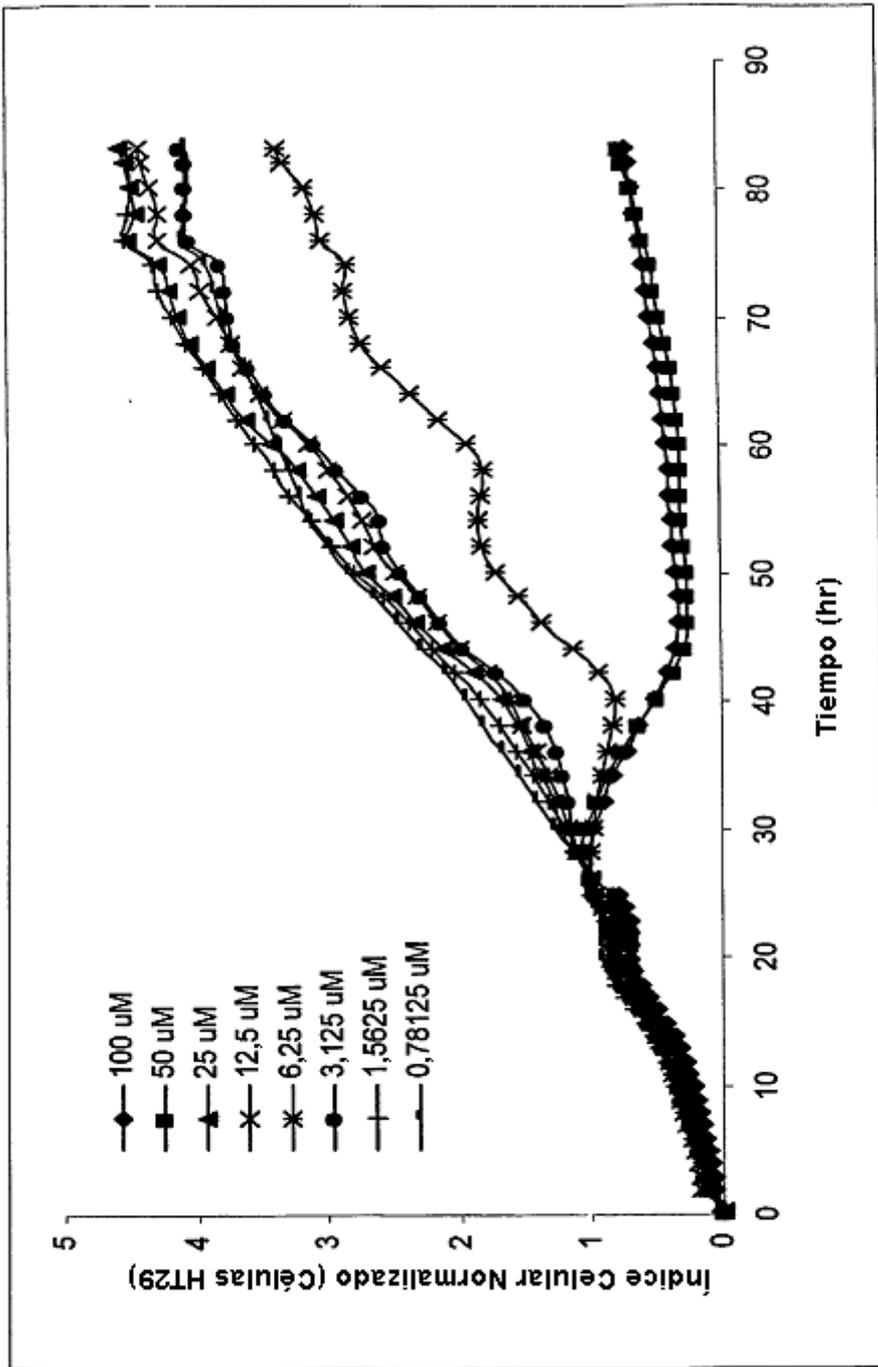


Figura 10

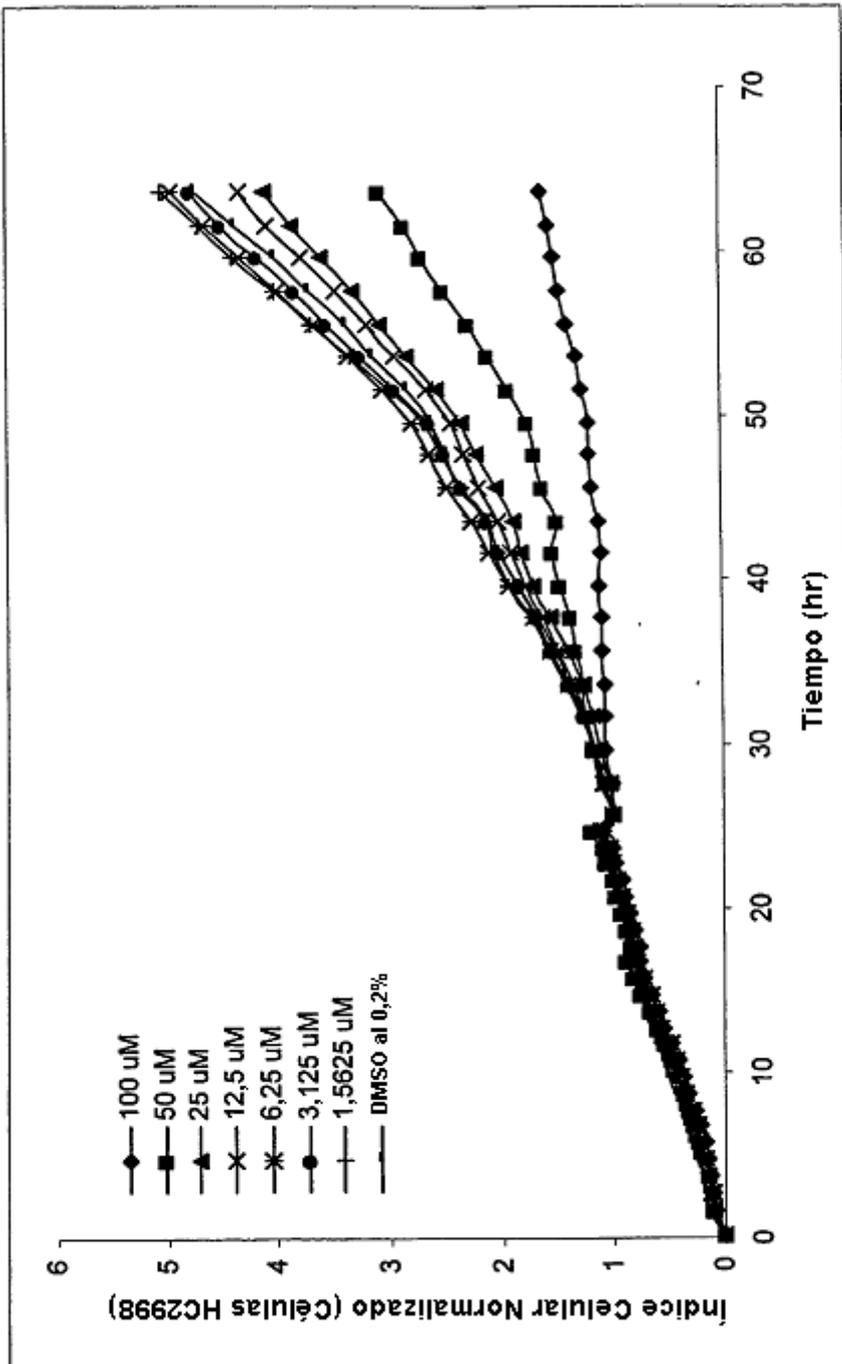


Figura 11

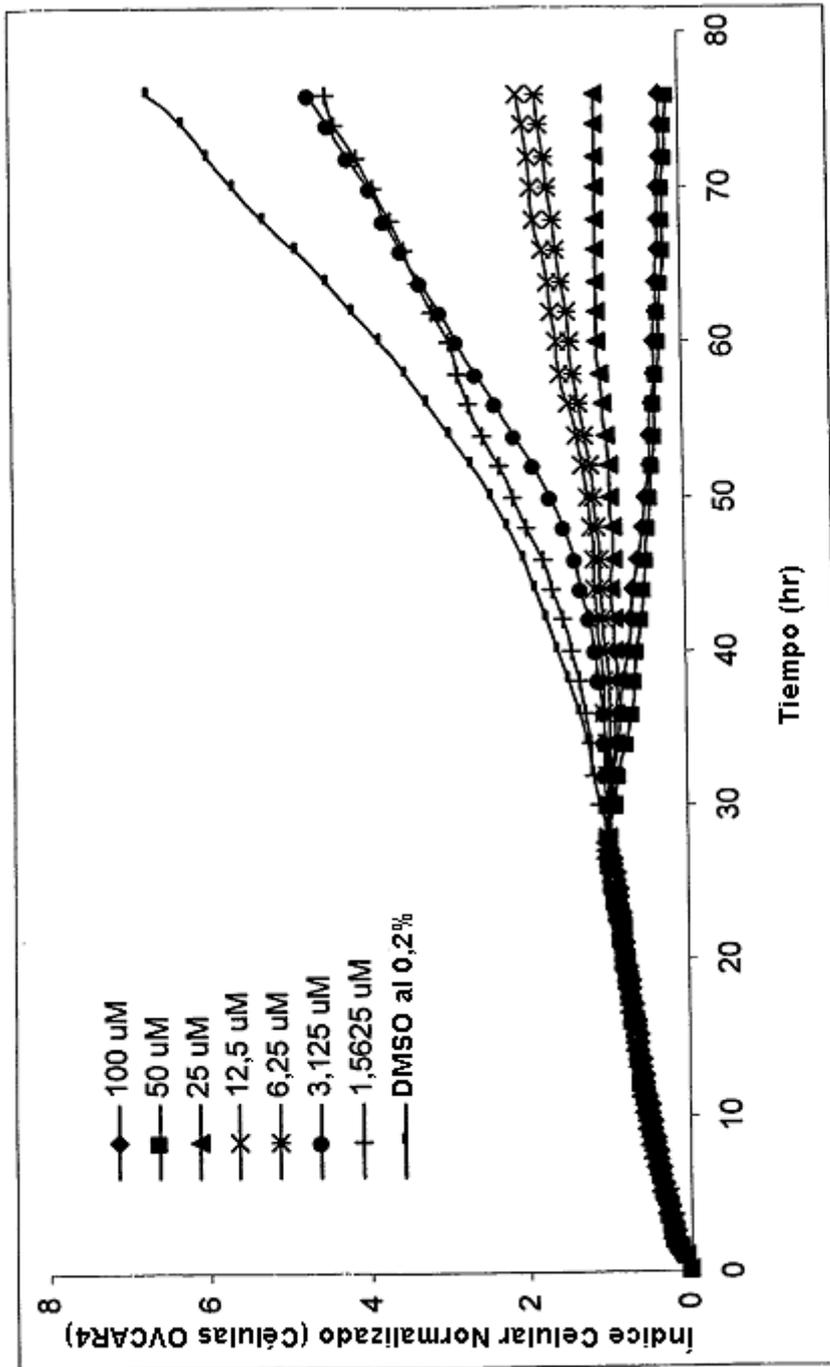


Figura 12

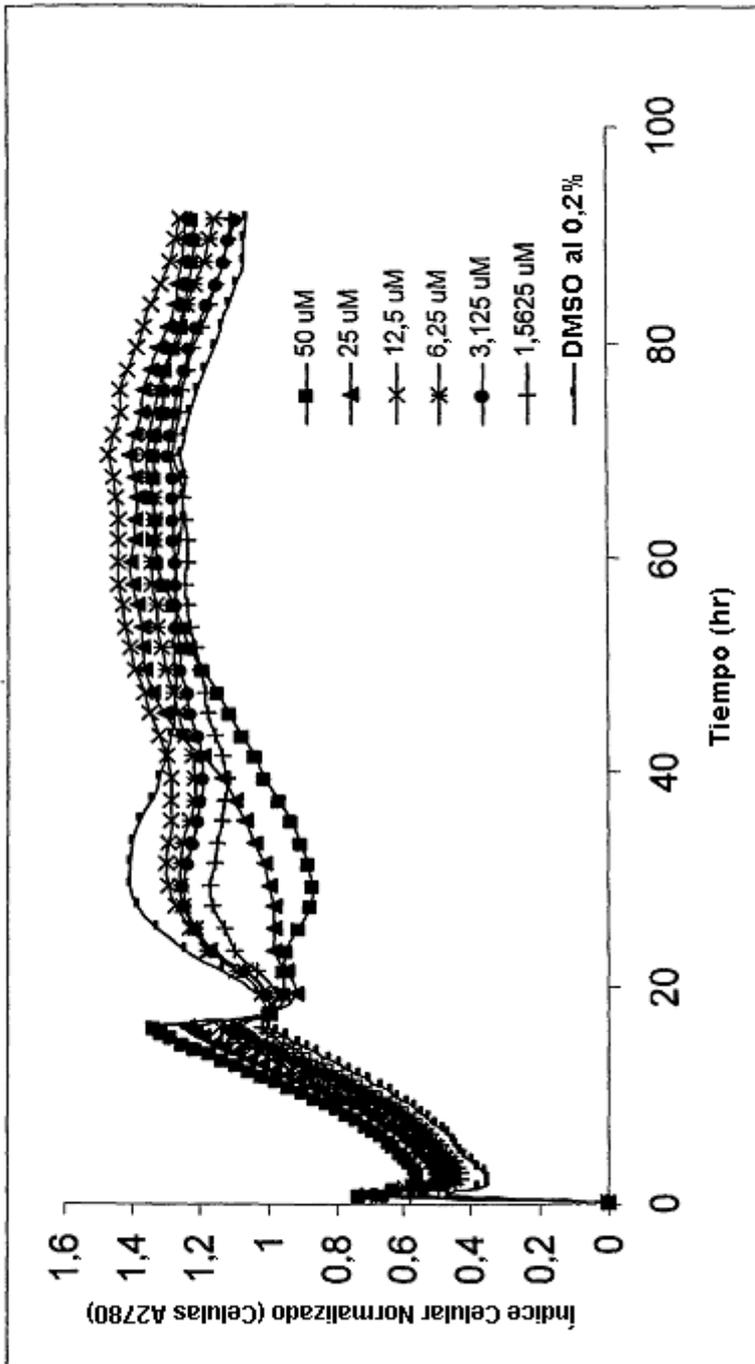


Figura 13

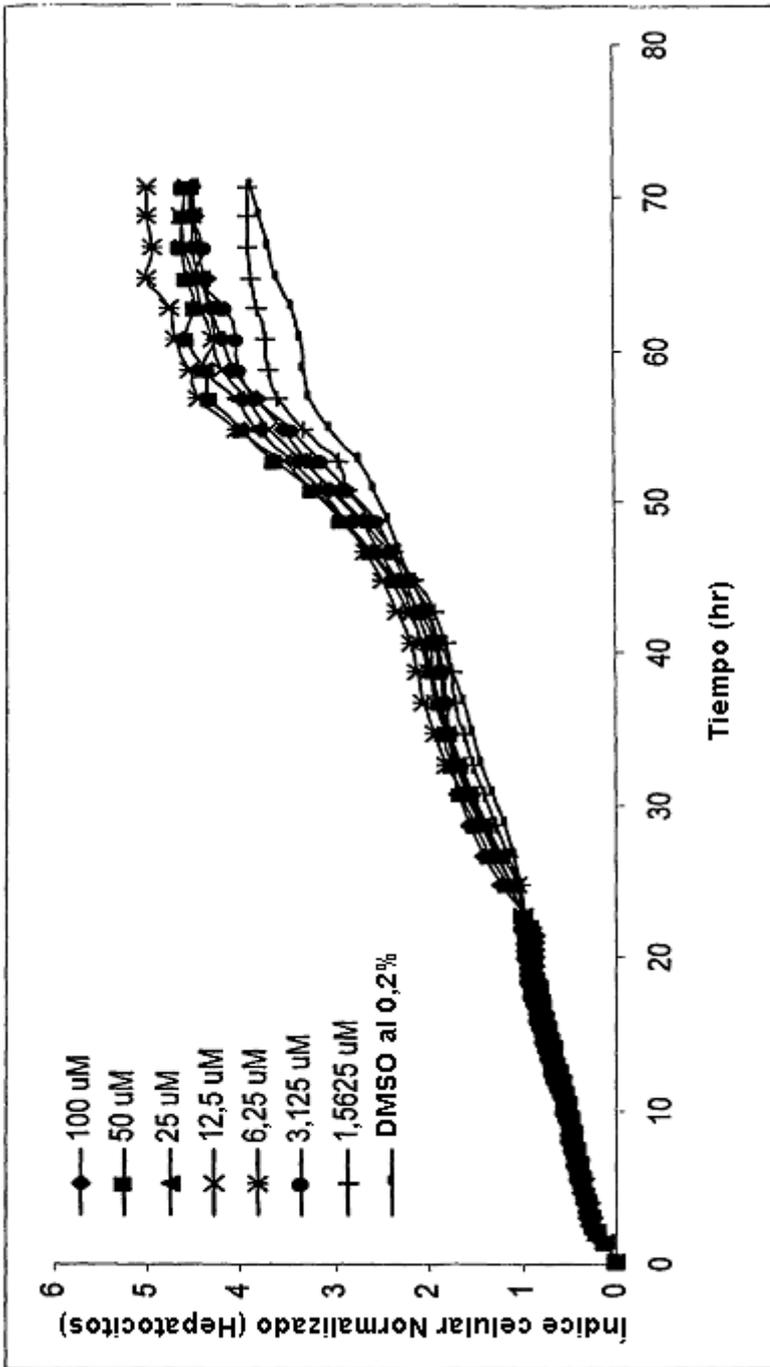


Figura 14

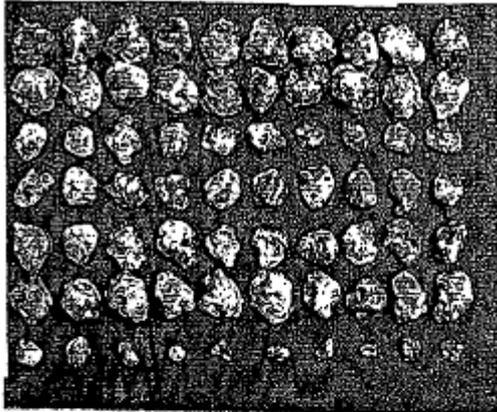


Figura 15

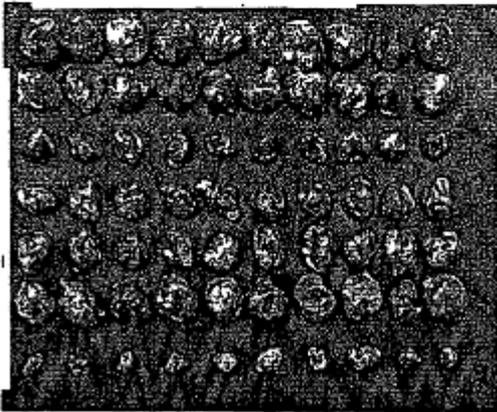


Figura 16

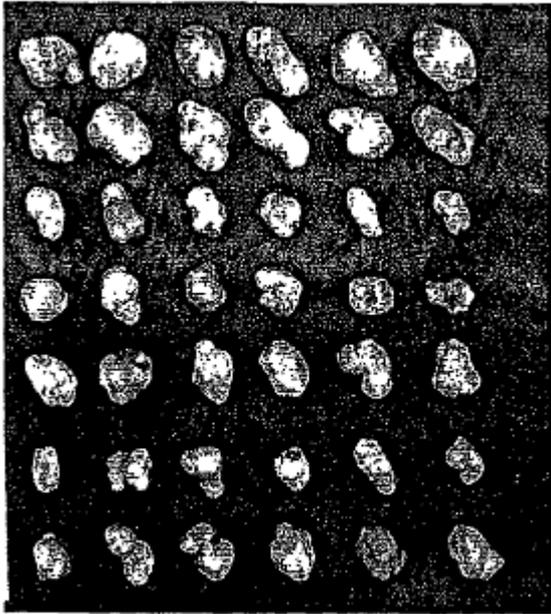


Figura 17

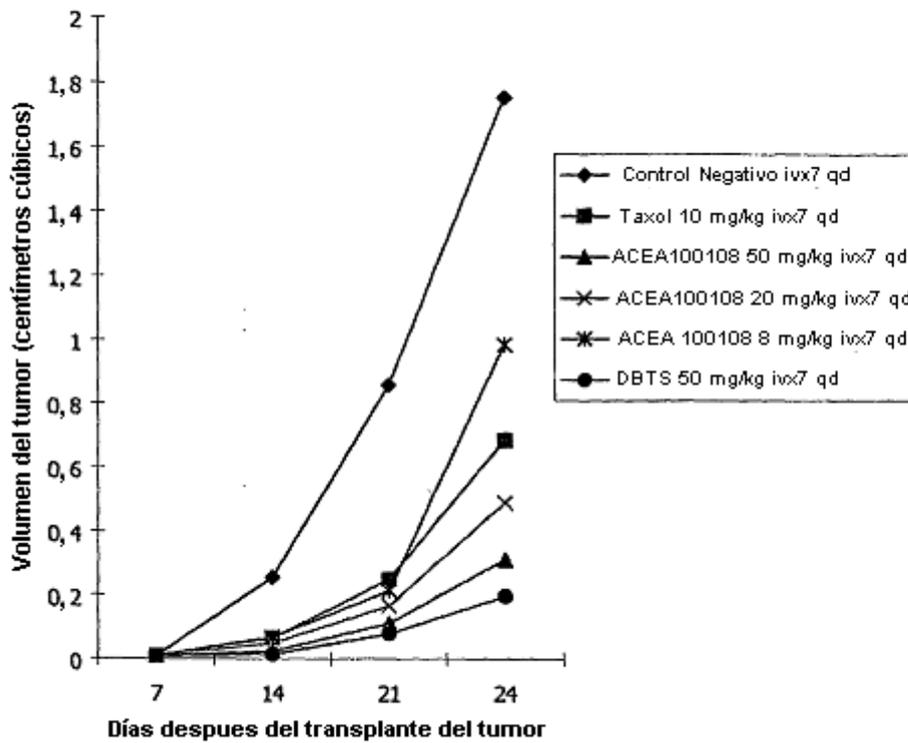


Figura 18

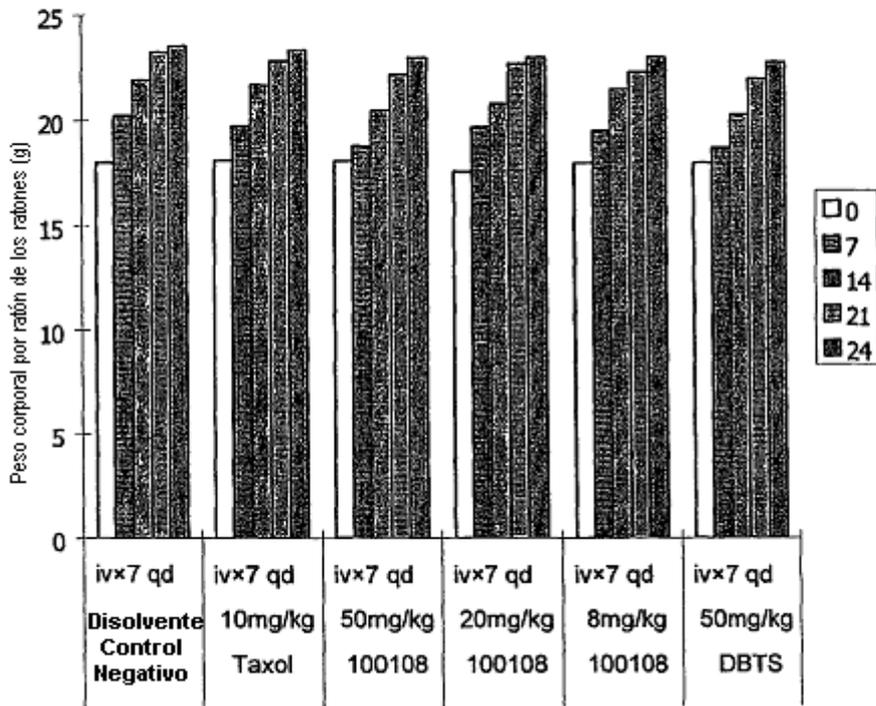


Figura 19

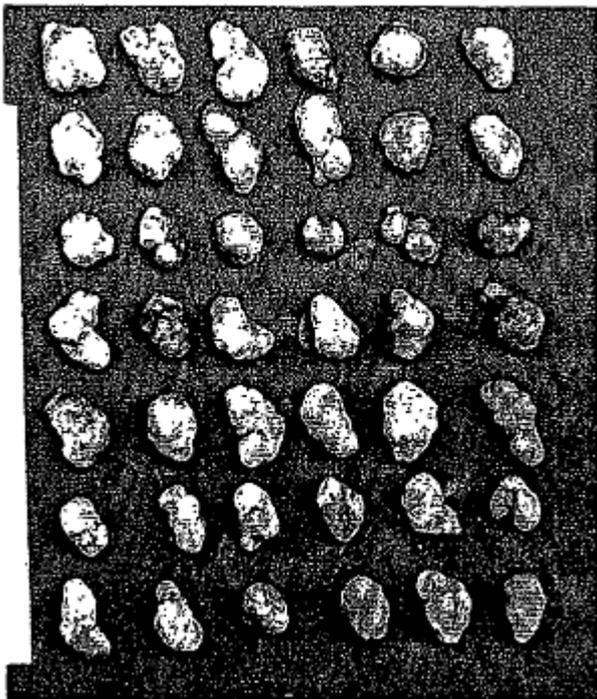


Figura 20

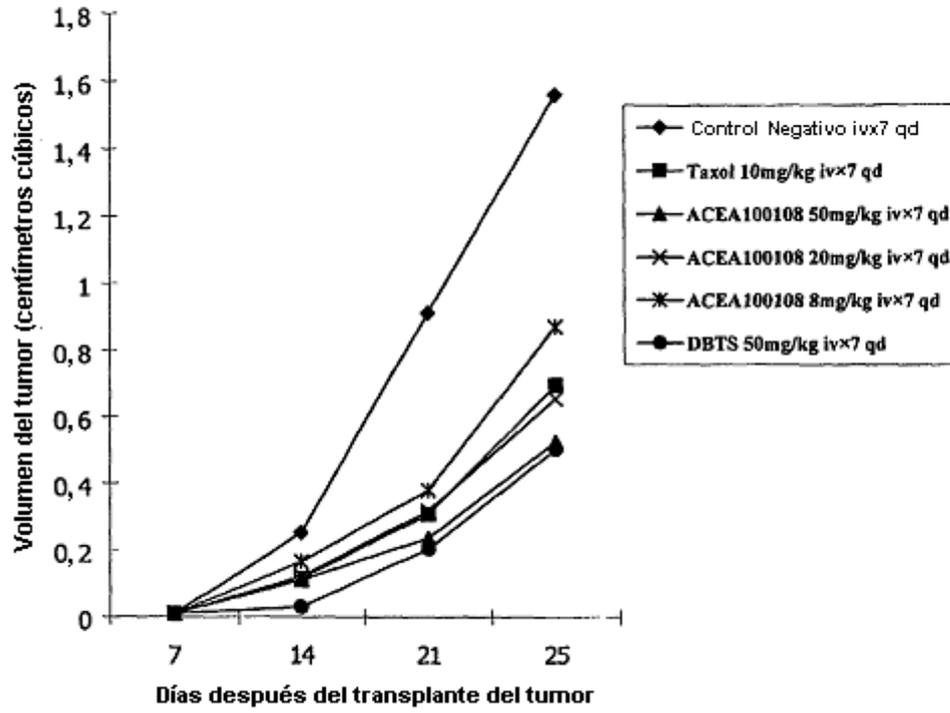


Figura 21

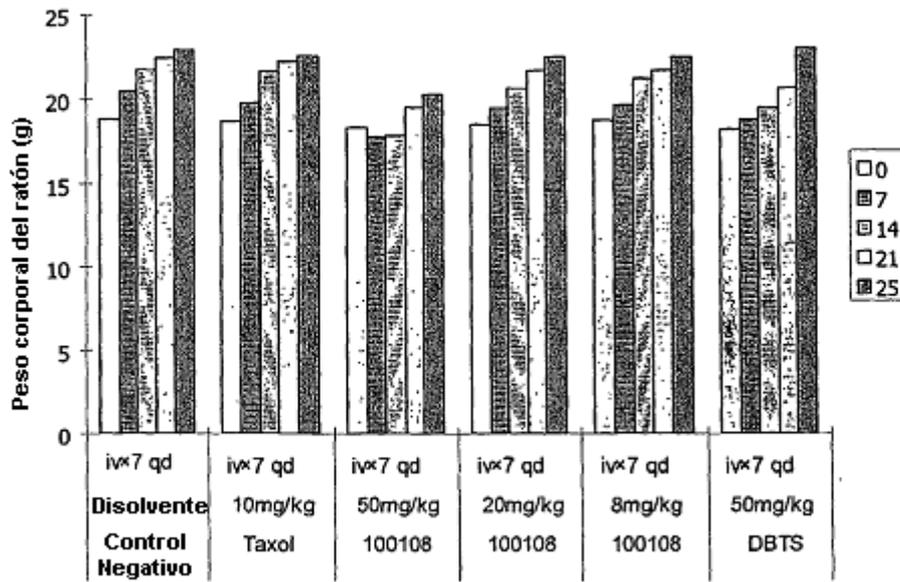


Figura 22



Figura 23

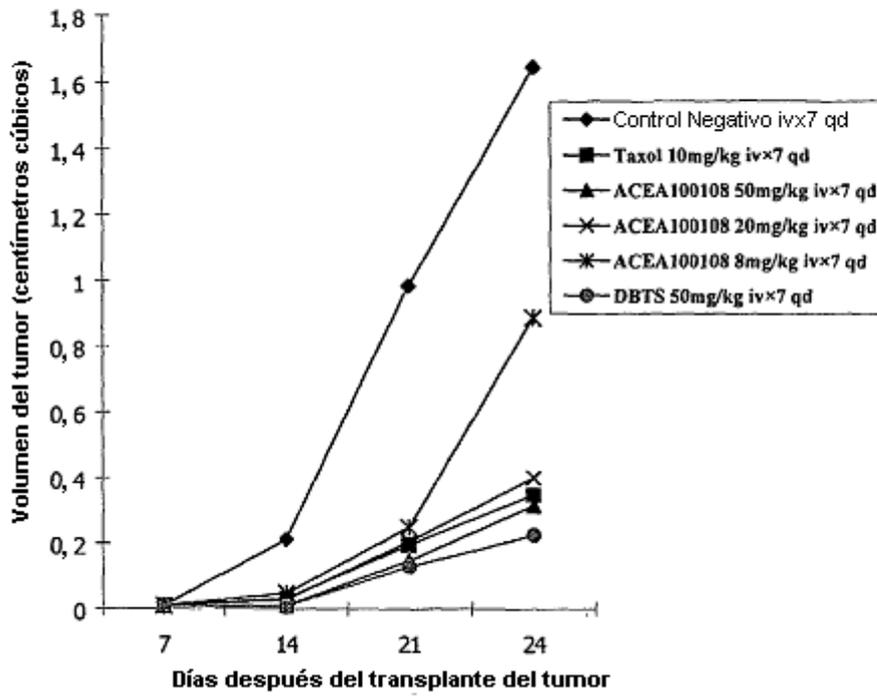


Figura 24

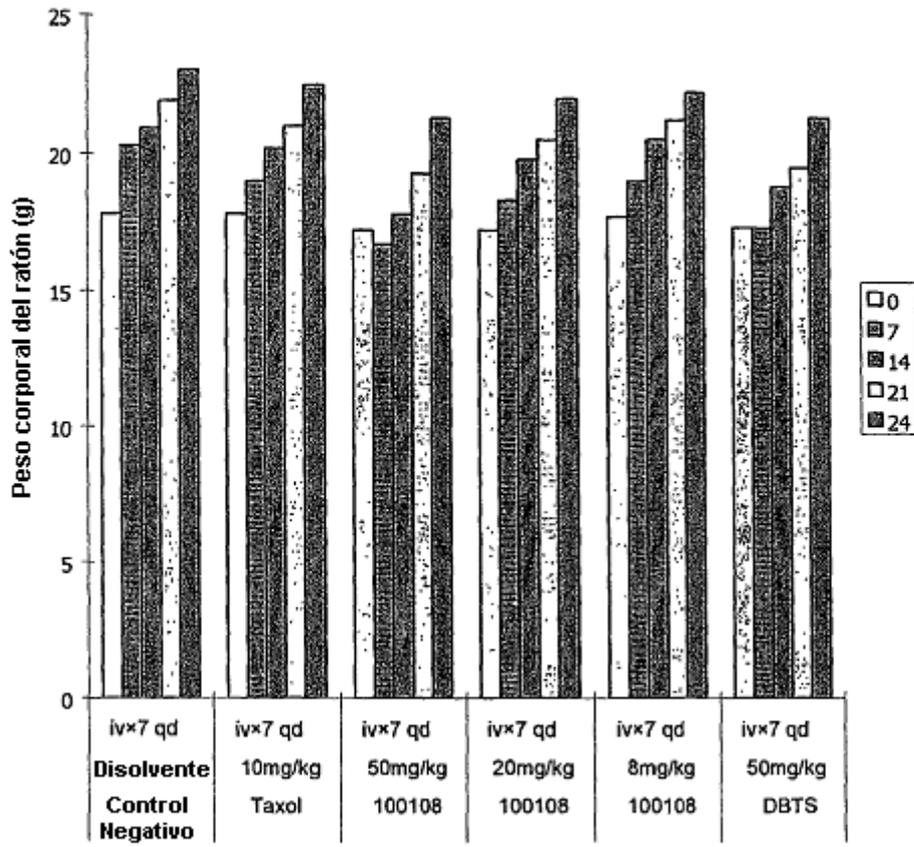


Figura 25

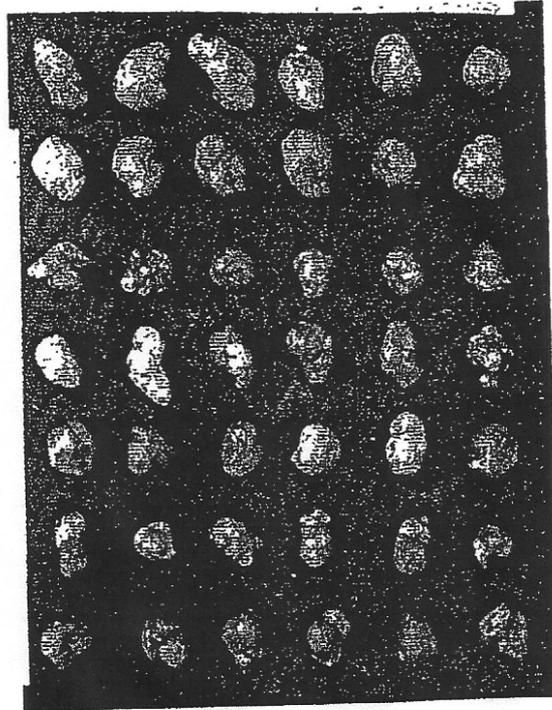


Figura 26A

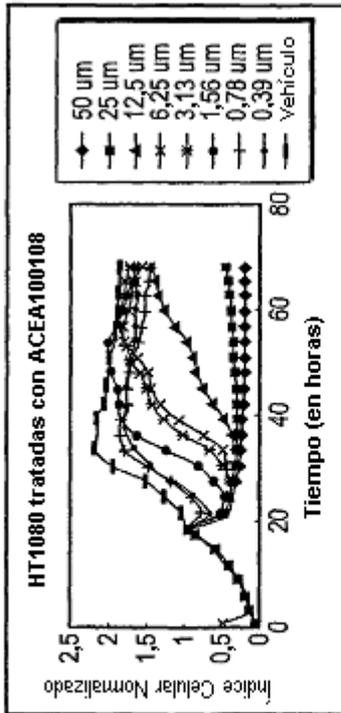


Figura 26B

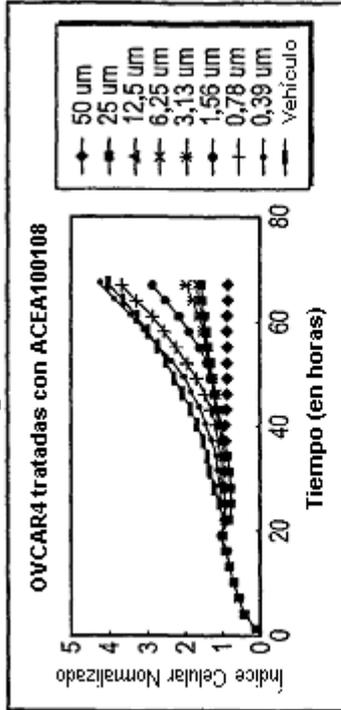


Figura 26C

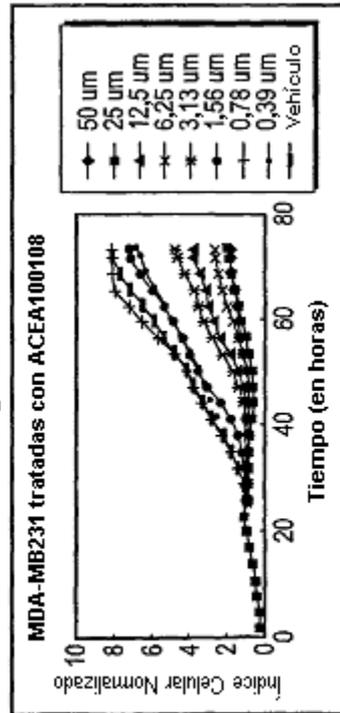


Figura 26D

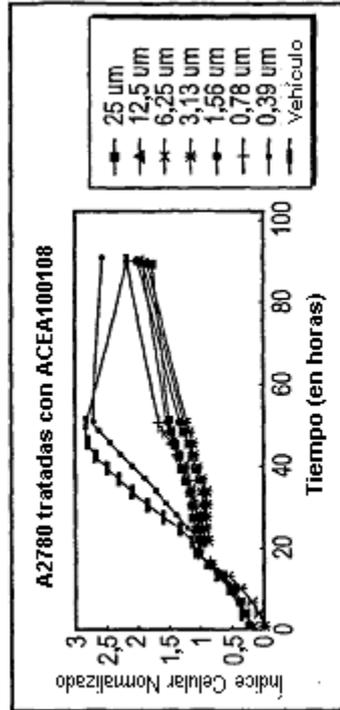


Figura 26F

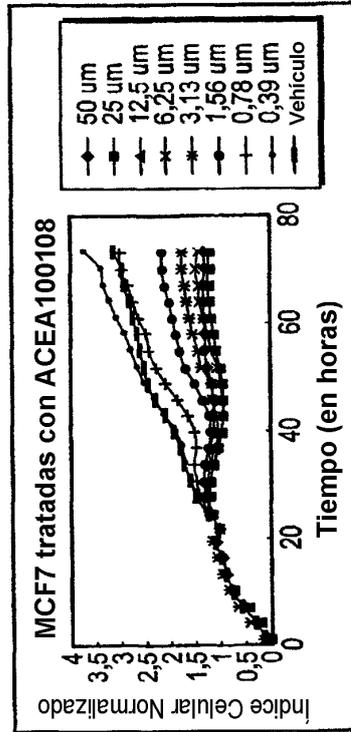


Figura 26E

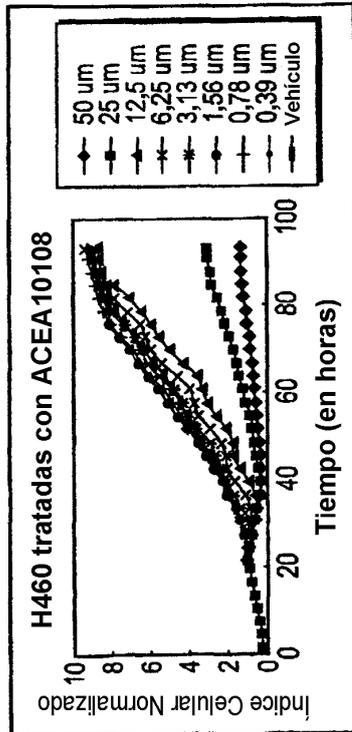


Figura 26G

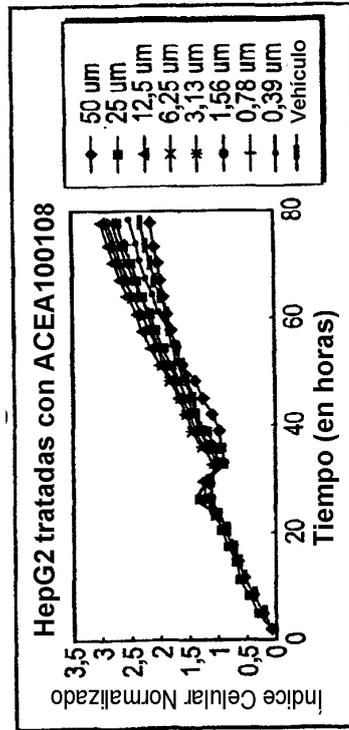


Figura 27A

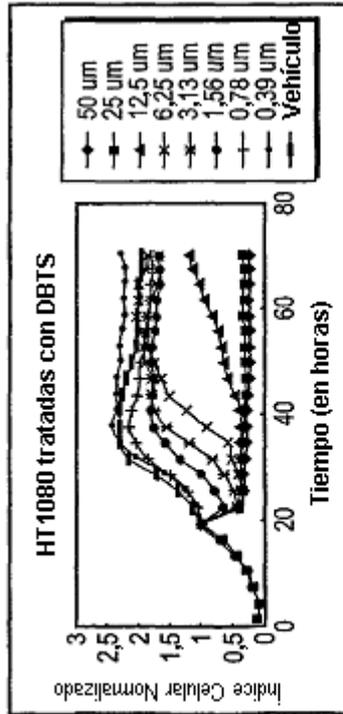


Figura 27B

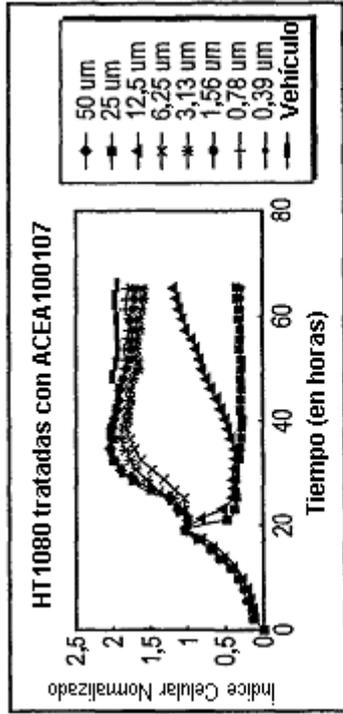


Figura 27C

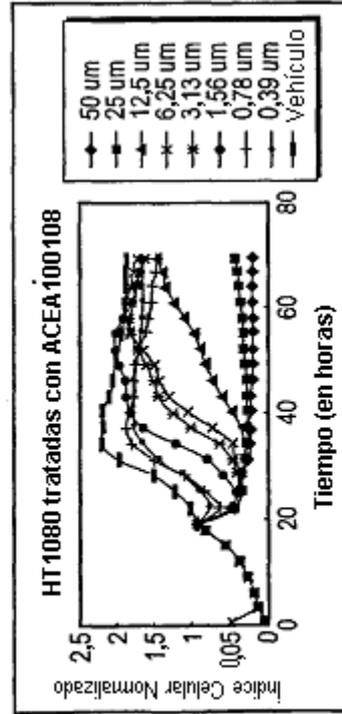


Figura 27D

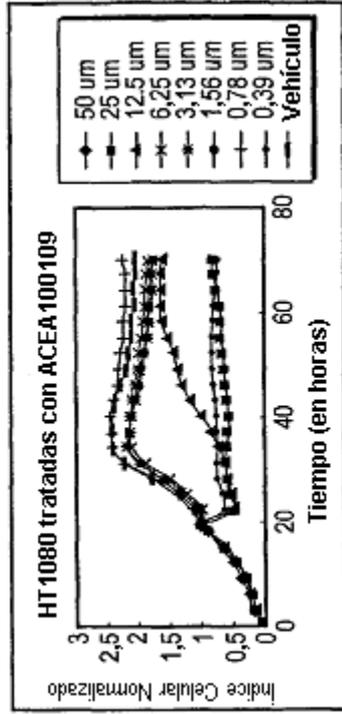


Figura 27F

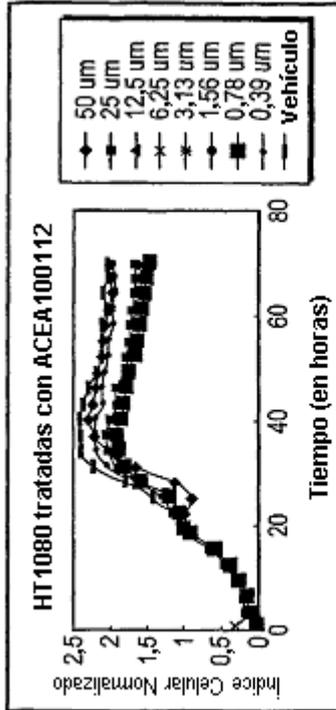


Figura 27E

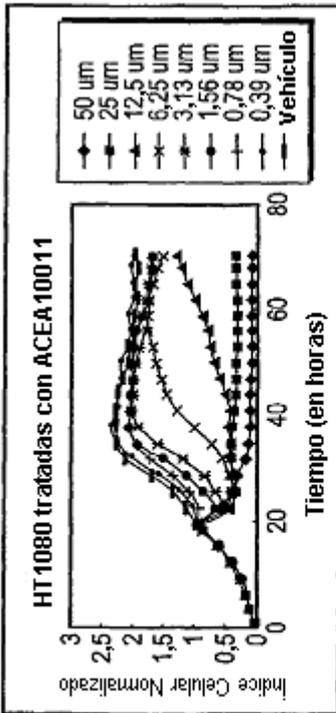


Figura 27H

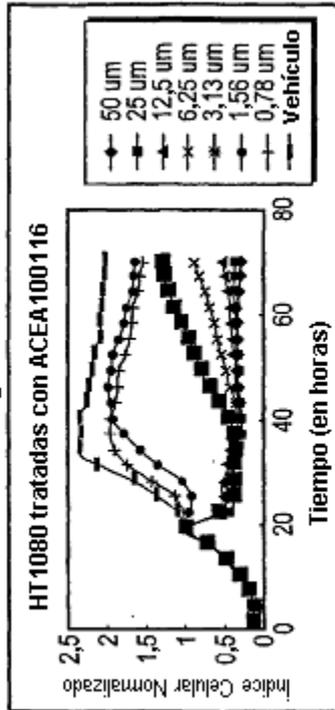


Figura 27G

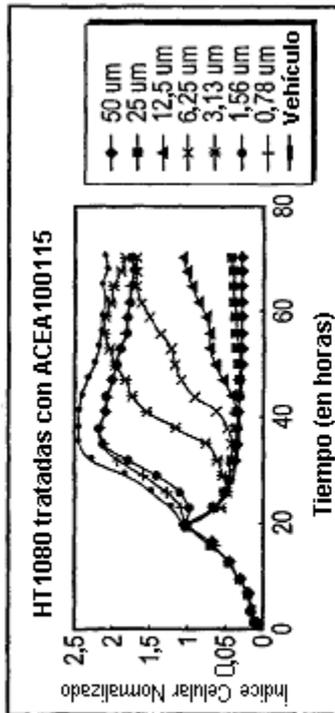


Figura 27I

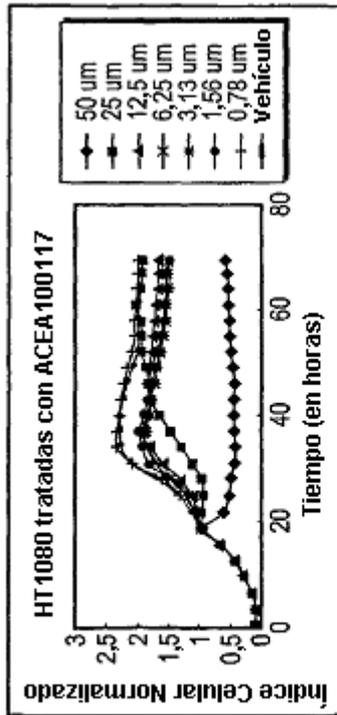


Figura 27J

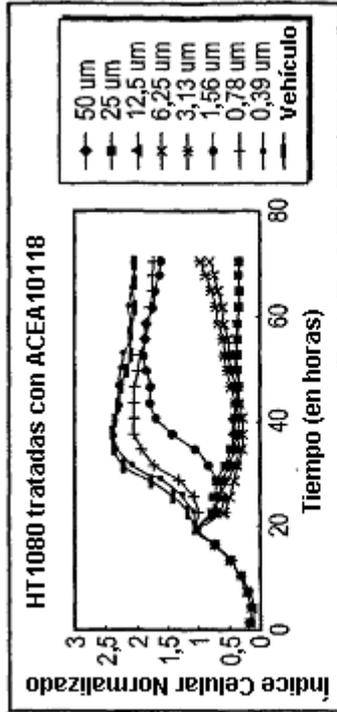


Figura 27K

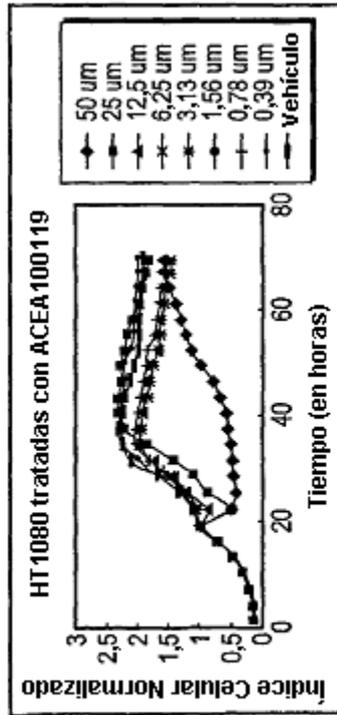


Figura 27L

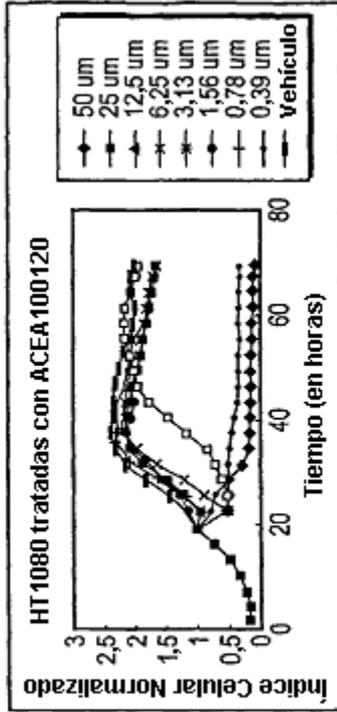


Figura 28

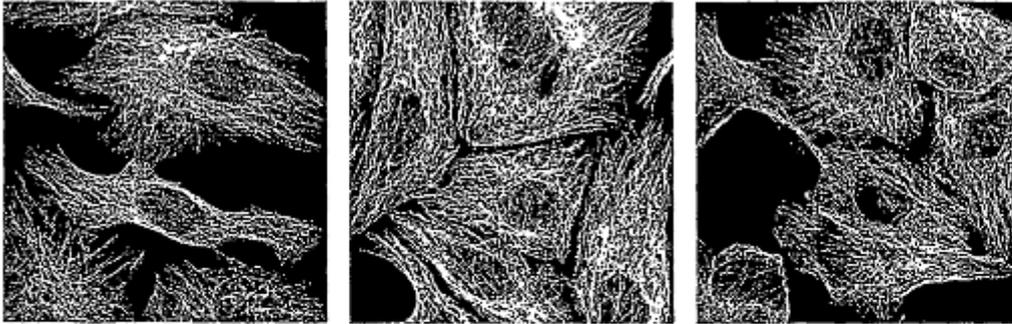


Figura 29

Paclitaxel, 1 uM

Paclitaxel, 3 uM

Paclitaxel, 9 uM

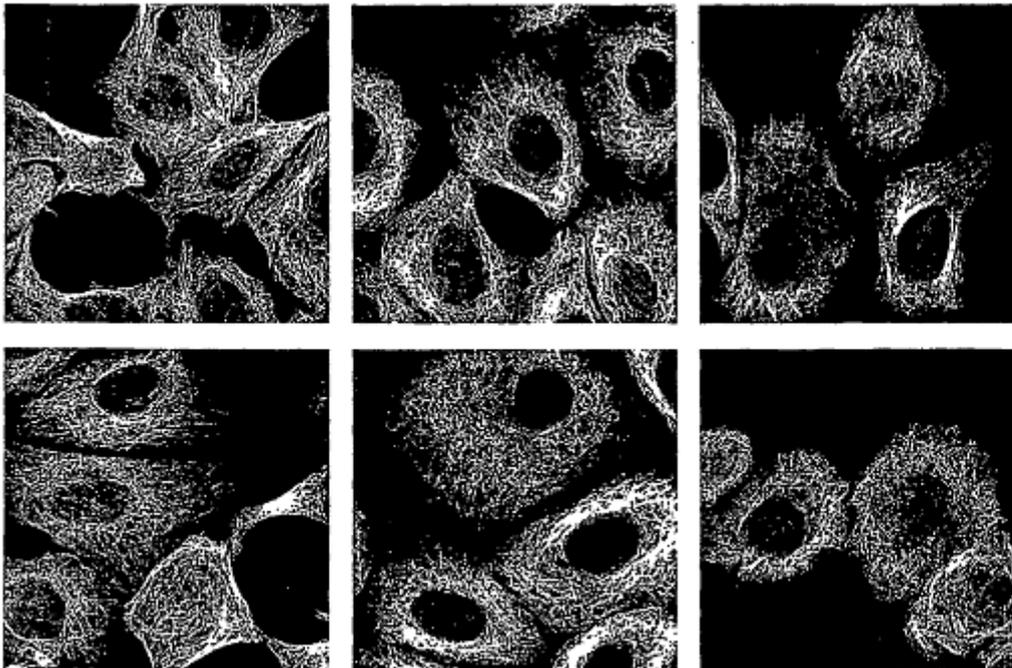


Figura 30

Paclitaxel, 1 uM

Paclitaxel, 3 uM

Paclitaxel, 9 uM

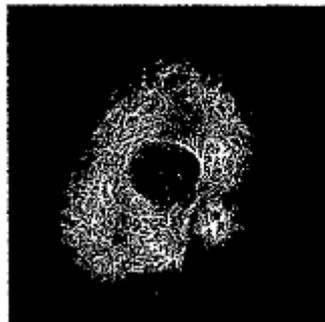
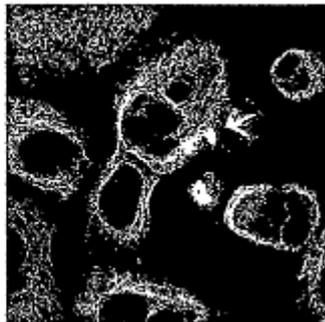
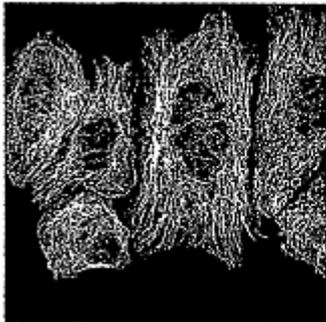
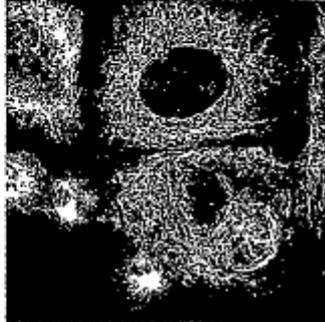


Figura 31

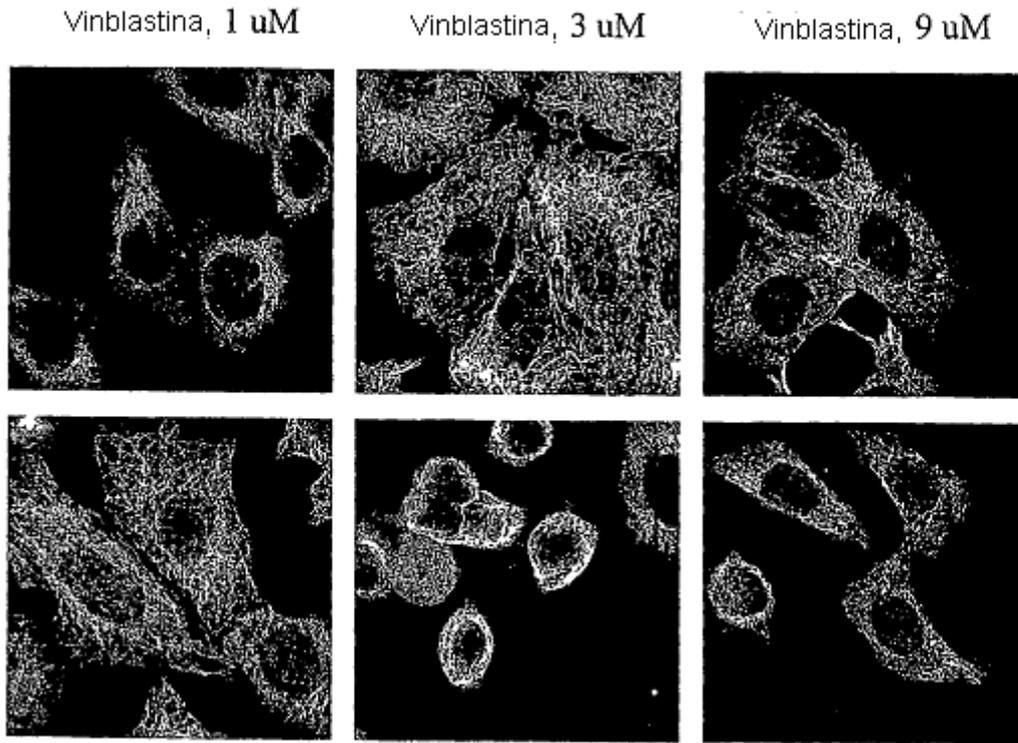


Figura 32

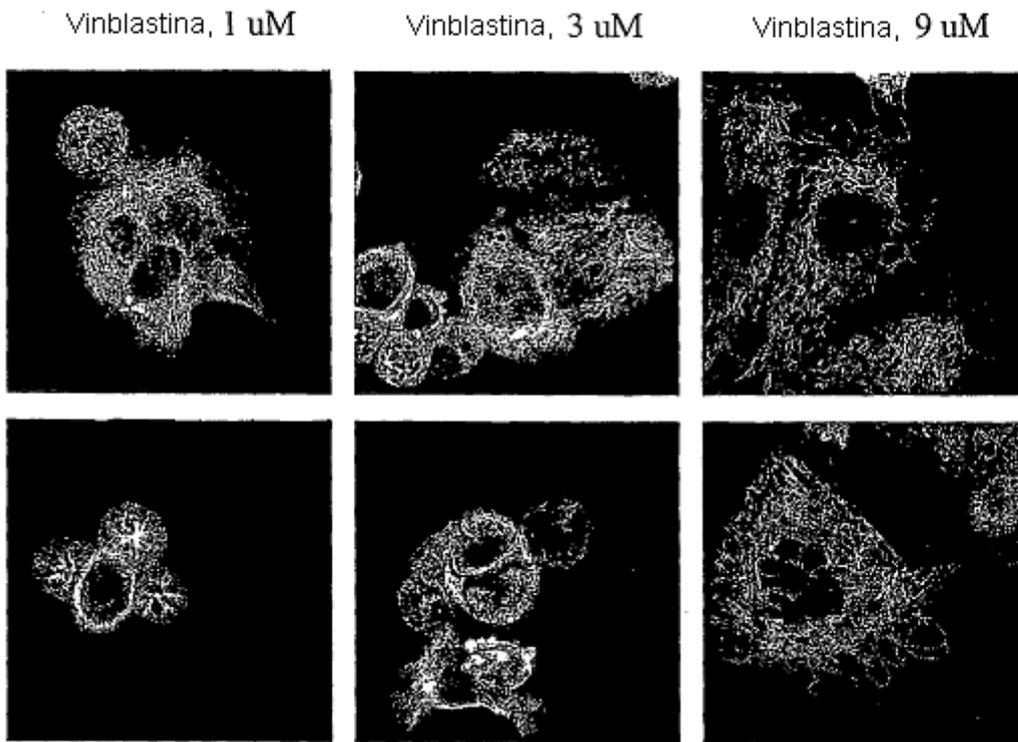


Figura 33

DBTS, 2 uM

DBTS, 6 uM

DBTS, 18 uM

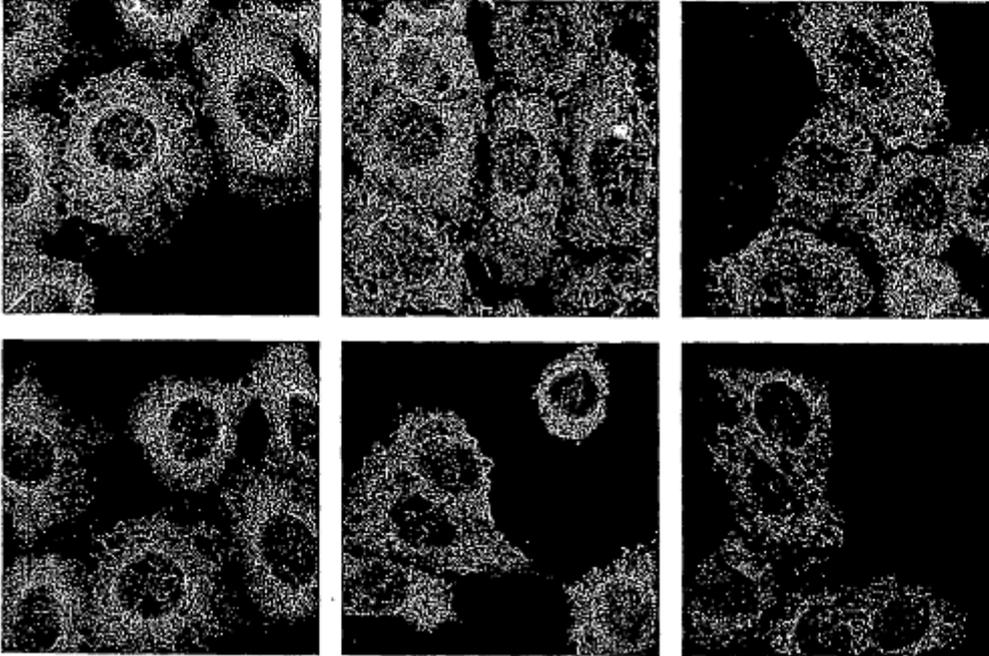
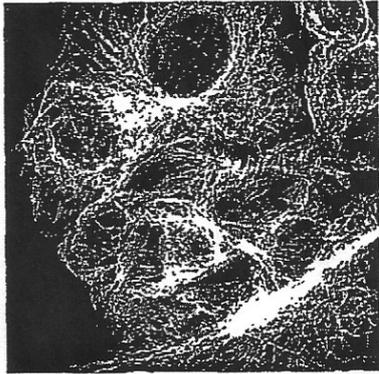


Figura 34

DBTS, 2 uM

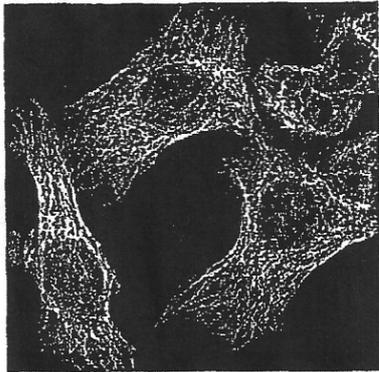


DBTS, 6 uM

muerto

DBTS, 18 uM

muerto



muerto

muerto

Figura 35

ACEA100108, 1 μ M

ACEA100108, 3 μ M

ACEA100108, 9 μ M

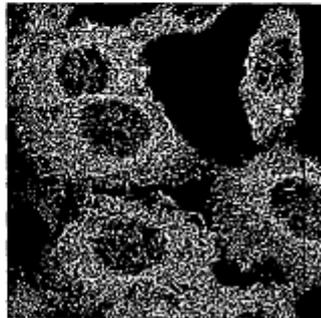
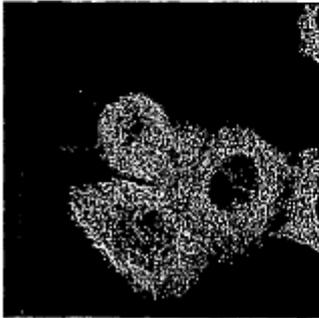
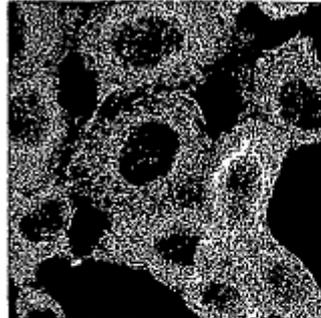
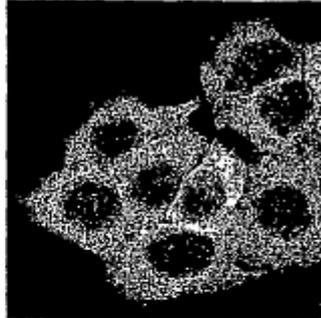
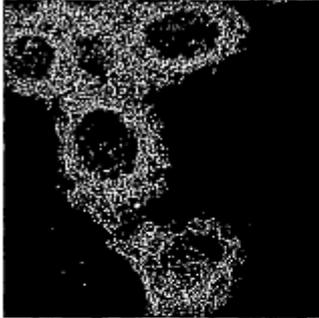


Figura 36

ACEA100108, 1 uM

ACEA100108, 3 uM

ACEA100108, 9 uM

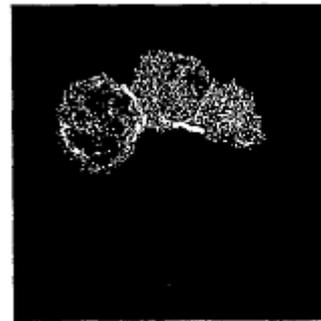
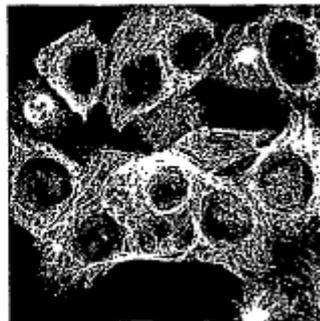
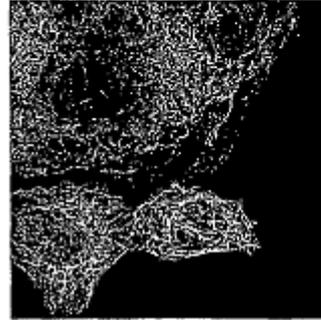
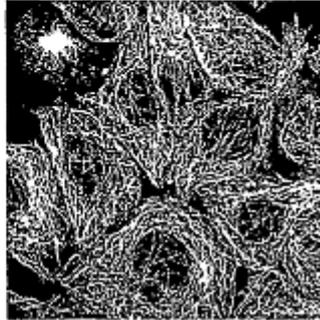


Figura 37

ACEA100116, 1 μ M

ACEA100116, 3 μ M

ACEA100116, 9 μ M

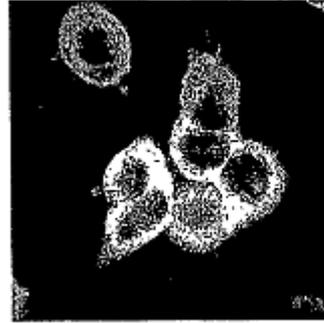
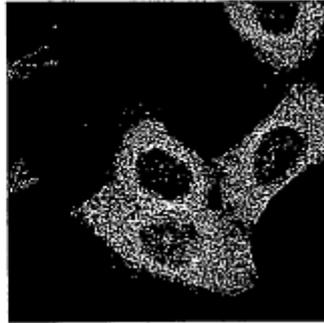
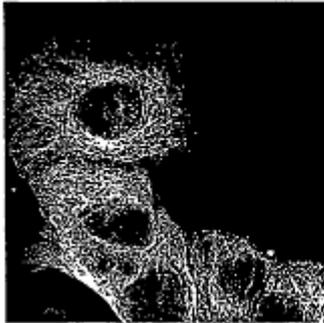
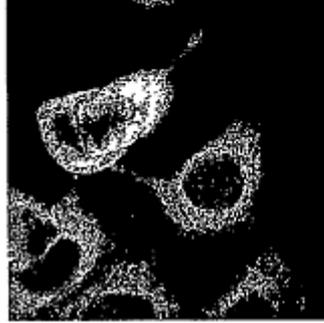
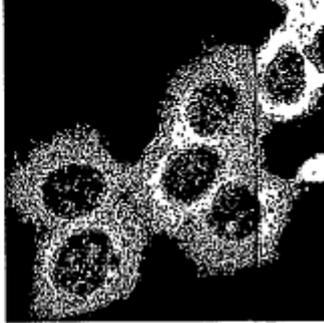
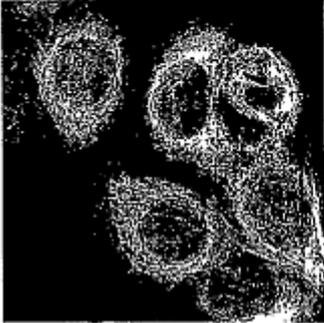
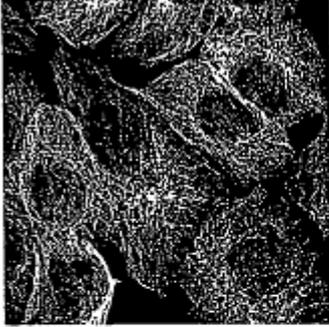


Figura 38

ACEA100116, 1 uM

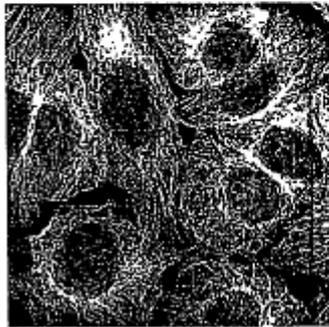
ACEA100116, 3 uM

ACEA100116, 9 uM



**En su mayor
parte muertos**

**En su mayor
parte muertos**



**En su mayor
parte muertos**

**En su mayor
parte muertos**

Figura 39A

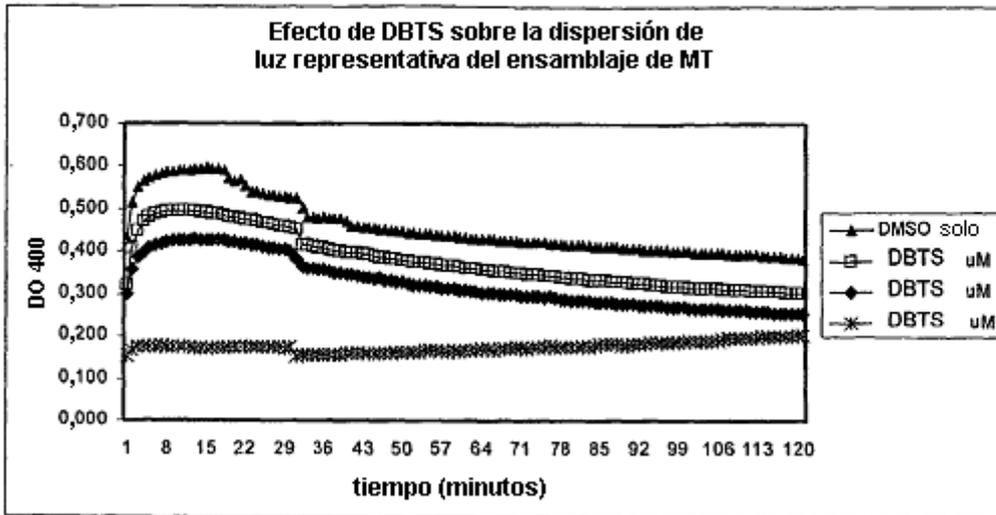


Figura 39B

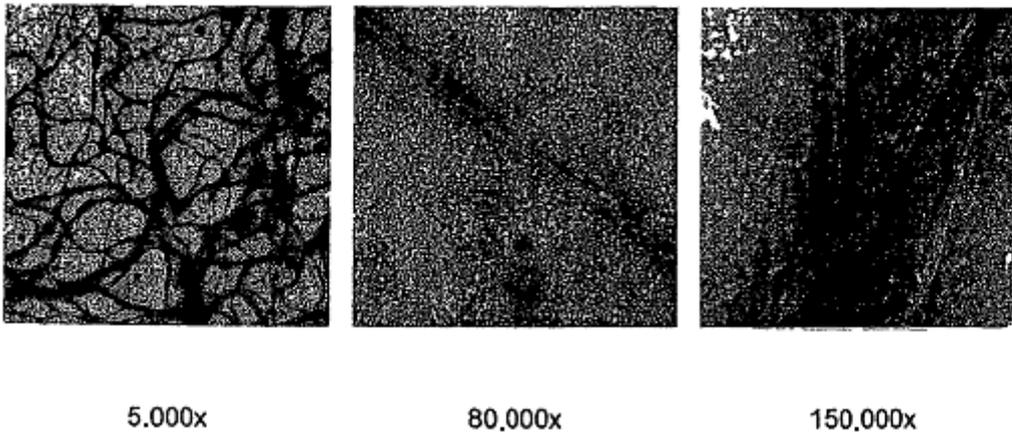
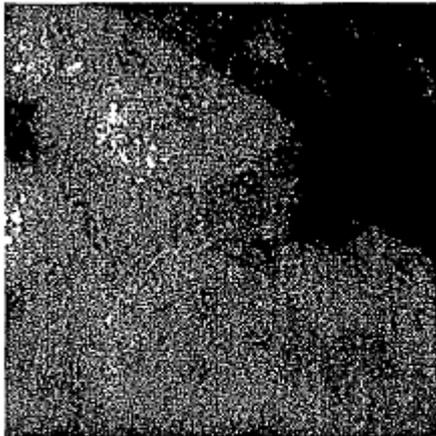
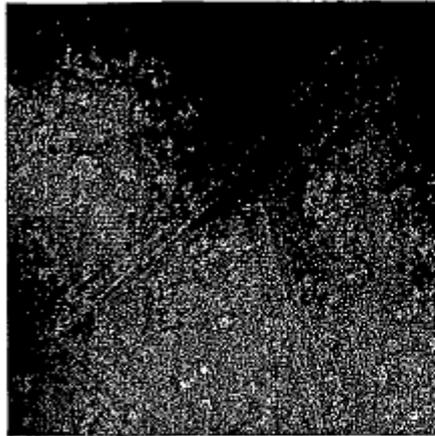


Figura 39C



100,000x



150,000x

Figura 40

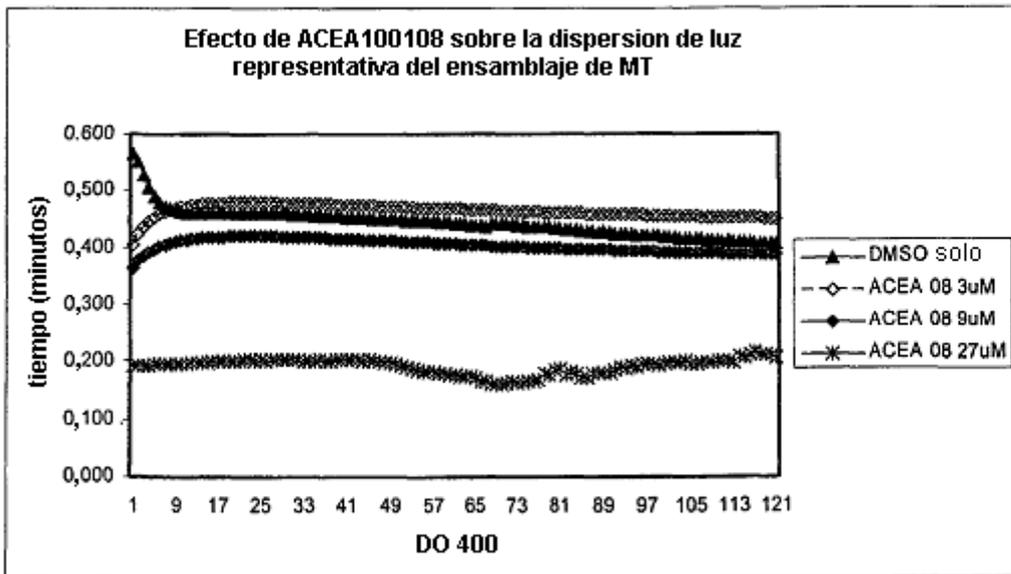


Figura 41

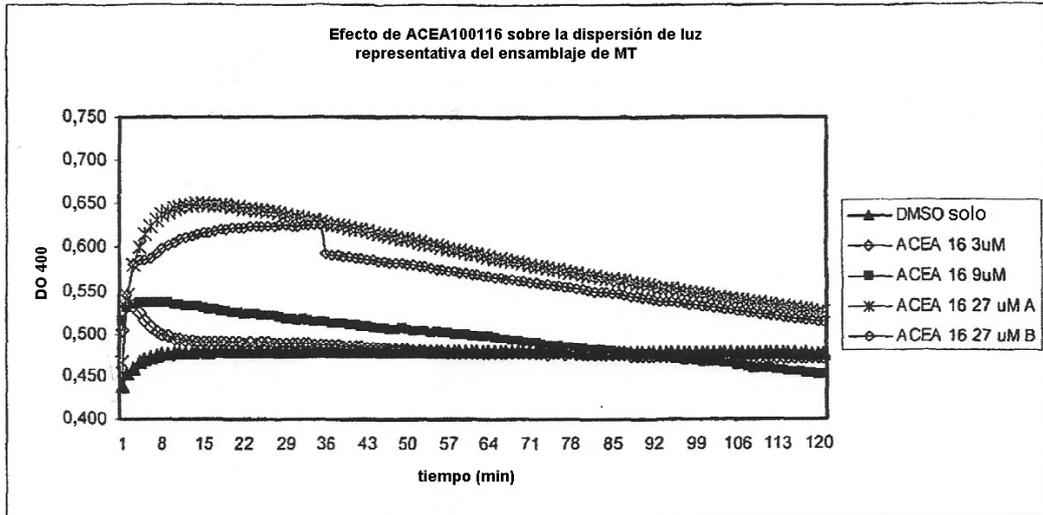


Figura 42

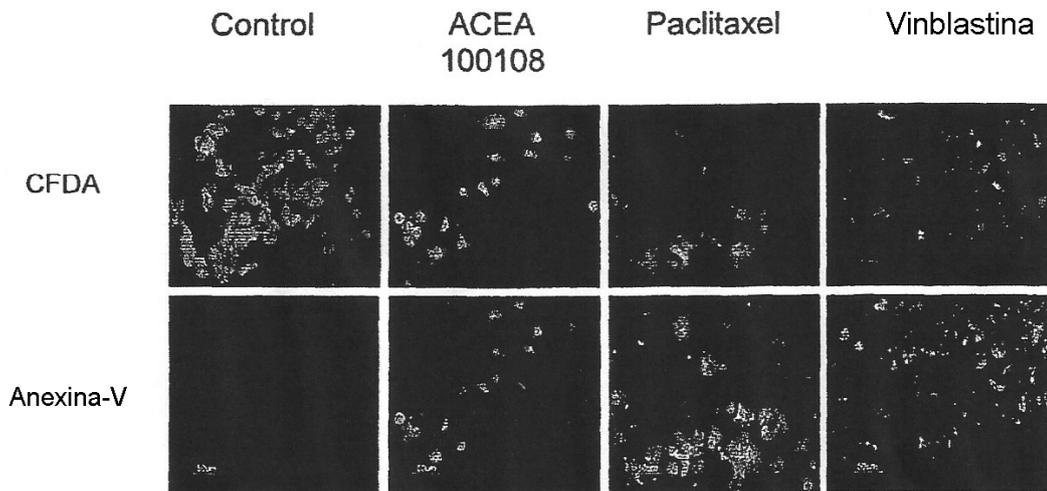
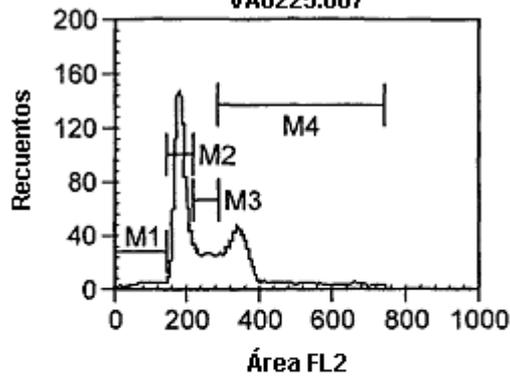
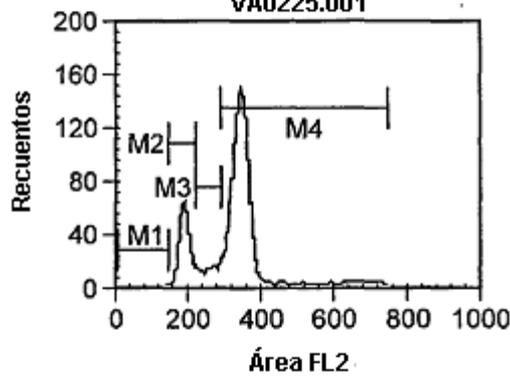


Figura 43

**Células A459 tratadas con DMSO
VA0225.007**



**Células A459 tratadas con ACEA100108
VA0225.001**



**Células A459 tratadas con paclitaxel
VA0225.004**

