

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 703**

51 Int. Cl.:

A61K 31/53 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)
A61K 31/4196 (2006.01)
A61K 31/4412 (2006.01)
A61K 31/4706 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2012 PCT/SE2012/000034**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012 WO12128689**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2012 E 12760260 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2688569**

54 Título: **Tratamiento de tumores sólidos**

30 Prioridad:

21.03.2011 SE 1100201

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

14.09.2018

73 Titular/es:

**VIVOLUX AB (100.0%)
C/O Nexttobe AB, Uppsala Science Park
751 83 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

**LINDER, STIG;
FRYKNÄS, MÅRTEN y
LARSSON, ROLF**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 681 703 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

Tratamiento de tumores sólidos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un compuesto según la fórmula I (CB21) para su uso en el tratamiento de tumores sólidos, en particular tumores sólidos diseminados, y a un medio para tal tratamiento.

10 **Antecedentes de la invención**

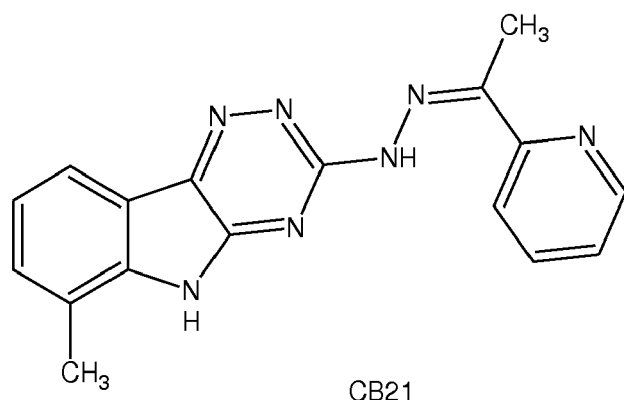
Se necesita desarrollar fármacos anticancerígenos nuevos y eficaces para pacientes que padecen cáncer diseminado. El desarrollo de fármacos para tumores sólidos está asociado con problemas específicos debido a condiciones biofísicas y metabólicas complejas en tejido tumoral en 3D que pueden ser difíciles de imitar en sistemas *in vitro* experimentales. Se sabe que la hipoxia y la difusión limitada de nutrientes conducen a quiescencia y resistencia a agentes anticancerígenos y radioterapia convencionales. Además, los fármacos anticancerígenos deben poder penetrar en el parénquima tumoral para alcanzar células cancerosas a concentraciones tóxicas. Algunos fármacos que están en uso clínico para el tratamiento de tumores sólidos muestran mala penetración en masas tumorales en 3D, lo que puede ser uno de los motivos de su limitada eficacia (1). Los esferoides multicelulares (MCS) imitan los tumores sólidos humanos mejor que los cultivos monocapa en 2D (2-4), y muchos fármacos usados clínicamente muestran potencia limitada sobre células cancerosas que se hacen crecer como MCS (5, 6). Por tanto, los MCS son más adecuados que los cultivos monocapa para seleccionar fármacos activos sobre tumores sólidos.

La muerte celular se subdivide a menudo en tres tipos de muerte celular: apoptosis (tipo I), muerte celular autofágica (tipo II) y necrosis (tipo III). La apoptosis está mediada por la activación de caspasas. La autofagia es un mecanismo evolutivamente conservado para la degradación de proteínas celulares de vida larga y orgánulos celulares dañados. La formación de autofagosomas es una característica principal de la autofagia. La formación de autofagosomas requiere la activación de fosfatidilinositol-3-cinasa de clase III y también depende de dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina (Atg-Atg12 y Atg8) (7). La autofagia protege a las células durante condiciones de privación de nutrientes, y las células experimentan apoptosis cuando se inhibe la autofagia (8-10). También se han observado características morfológicas de autofagia durante la muerte celular en condiciones de inhibición de caspasa (11).

35 **Sumario de la invención**

Según la invención se da a conocer un quelante de hierro que puede penetrar en las células, para su uso en el tratamiento de un tumor canceroso sólido.

Según la presente invención se da a conocer el uso de una N-(1-piridin-2-il-metiliden)-N-(9H-1,3,4,9-tetraaza-fluoren-2-il)-hidrazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma de fórmula I (CB21), para tratar un tumor sólido en una persona afectada por cáncer.



45 En esta solicitud, se pretende que el compuesto de fórmula I incluya cualquier sal o complejo farmacéuticamente aceptables del mismo.

Eshba *et al.*, (44) dan a conocer derivados de N-(1-piridin-2-il-metiliden)-N-(9H-1,3,4,9-tetraaza-fluoren-2-il)-hidrazina como agentes antivirales y anticancerígenos, en los que un compuesto (compuesto 20) muestra algo de efecto anticancerígeno.

El documento WO 2009/035534 da a conocer un método para tratar enfermedades oculares isquémicas asociadas con compuestos similares a la fórmula I de la presente invención, pero no da a conocer el uso de estos compuestos

como agentes anticancerígenos.

Según un aspecto preferido de la invención se da a conocer una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer, que comprende un compuesto de la invención y un portador farmacéutico. La composición farmacéutica de la invención puede administrarse por cualquier vía adecuada, tal como por vía oral o parenteral. Los portadores adecuados comprenden dimetilsulfóxido y medios acuosos, tales como mezclas que comprenden dimetilsulfóxido y agua. Portadores fluidos preferidos son aquellos que pueden disolver el compuesto de la invención. Otros portadores fluidos preferidos, en particular portadores acuosos, son aquellos que comprenden el compuesto de la invención en forma finamente dispersada, tal como en forma de micropartículas con un tamaño de 10 μm o menos.

El compuesto de la invención es un quelante de hierro que puede penetrar en las células. Aunque no se desea limitarse a la teoría, los inventores creen que el efecto anticancerígeno del compuesto de la invención se basa en sus propiedades quelantes de hierro.

Ahora se describirá la invención en más detalle mediante referencia a varias realizaciones preferidas ilustradas en un dibujo que comprende varias figuras.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra la actividad *in vivo* de CB21 en xenoinjertos de carcinoma de cabeza y cuello FaDu. Se trataron ratones SCID que portaban tumores FaDu con mg/kg de CB21 y se calculó el volumen de tumor.

Las figuras 2a-2h ilustran la citotoxicidad de N-(1-piridin-2-il-etiliden)-N-(9H-1,3,4,9-tetraaza-8-metil-fluoren-2-il)-hidrazina (identificada a continuación como "CB21") con respecto a MCS de HCT116 y el margen terapéutico del efecto citotóxico. Figura 2a: Morfología e inducción de caspasa-3 en MCS tratados con CB21. Se trataron MCS de HCT116 durante 6 horas con CB21 6 μM , seguido por cambio a medio libre de fármaco e incubación adicional. Se seccionaron y se tiñeron MCS para determinar caspasa-3 activa. Figura 2b: Sobrecrecimiento clonogénico de células tratadas con los compuestos indicados. Figura 2c: Proliferación de células HCT116 monocapa en presencia o ausencia de CB21. Se sembraron las células a 7.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se trataron con CB21 3, 6 y 12,5 μM . Figura 2d: Incorporación de EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) en células HCT116 monocapa 24 horas después de la adición de CB21 6 μM . Se incubaron las células durante 30 minutos con EdU, se fijaron y se analizaron mediante ArrayScan. Figura 2e: Cuantificación de señal de EdU en el experimento mostrado en la figura 2d. Figura 2f: Proliferación de células hTERT-RPE1 monocapa en presencia o ausencia de CB21. Se sembraron las células a 7.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se trataron con CB21 3, 6 y 12,5 μM . Figura 2g: CB21 no afecta a la viabilidad de células hTERT-RPE1 confluentes. Se sembraron las células a 7.000 ó 70.000 por pocillo en placas de 96 pocillos en presencia o ausencia de CB21. Figura 2h: Morfología de células HCT116 y hTERT-RPE1 tras exposición a CB21 6 μM .

Las figuras 3a-3e ilustran que CB21 es un potente quelante de hierro. Figura 3a: Puntuaciones según la base de datos de Connectivity Map (Cmap). Figura 3b: Viabilidad de células tratadas con CB21 6 μM en presencia o ausencia de cloruro de hierro. Izquierda: células HCT116; derecha células HCT116 p53^{-/-}. Figura 3c: Viabilidad de células HCT116 tratadas con CB21 y diferentes quelantes de hierro para comparación. Figura 3d: Viabilidad de células HCT116 tratadas con 7 compuestos con estructuras relacionadas con CB21. Figura 3e: CB21 es el más eficaz de una serie de compuestos relacionados para reducir la viabilidad de MCS.

Las figuras 4a-4f ilustran la inducción de autofagia por CB21 en comparación con otros quelantes de hierro. Figura 4a: Morfología de células HCT116 monocapa expuestas a CB21 6 μM durante 6 horas y 42 horas o 90 horas adicionales en medio libre de fármaco. Figura 4b: Tinción de células tratadas con CB21 con un anticuerpo para LC3. Figura 4c: Inducción de proteína LC3-I y LC3-II por CB21 en monocapa y MCS HCT116. Se trataron las células durante 6 horas (6 μM), y luego se incubaron adicionalmente. Se extrajeron proteínas y se sometieron a análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Figura 4d: Inducción de proteína LC3-I y LC3-II por CB21 en células hTERT-RPE1 monocapa y MCS. Figura 4e: Inducción de LC3-I y LC3-II mediante diferentes quelantes de hierro. Se trataron las células con VLX50 (50 μM); deferasirox (60 μM), deferoxamina (200 μM), ciclopiroxolamina (15 μM), CB21 (5 μM), rapamicina (0,1 μM), NVP-BEZ235 (0,2 μM). Figura 4f: Morfología de células periféricas y del núcleo visualizadas mediante microscopía electrónica. Se trataron MCS durante 6 horas con C21 6 μM y se incubaron adicionalmente en medio libre de fármaco durante los tiempos indicados y se seccionaron. Obsérvese la aparición de mitocondrias hinchadas a las 24 horas de tratamiento con CB21.

Las figuras 5a-5f ilustran ejemplos en los que la inhibición de autofagia inducida por CB21 aumenta la citotoxicidad de CB21. Figura 5a: Se trataron células monocapa HCT116 con CB21 6 μM y/o 3-MA 10 μM y se determinó la viabilidad celular tras 48 horas. Figura 5b: Se transfectaron células monocapa HCT116 con ARNip para Beclin/Atg6 o ARNip de control. Tras 24 horas, se trataron células con CB21 6 μM tal como se indica. Figura 5c: la bafilomicina A (10 μM) inhibe la formación de vesículas positivas para LC3 en células tratadas con CB21. Se fijaron las células y se tiñeron para determinar LC3 tras el tratamiento con fármaco en los tiempos indicados. Figura 5d: la bafilomicina A

aumenta la citotoxicidad de CB21. Se trataron las células con CB21 6 μ M y/o bafilomicina A 10 μ M y se fotografiaron las células en los tiempos indicados. Figura 5e: la cloroquina aumenta la citotoxicidad de CB21 en cultivo monocapa. Se trataron células HCT116 con CB21 6 μ M y/o cloroquina 10 μ M. Se monitorizó la proliferación celular mediante cálculo de la confluencia de cultivo. Figura 5f: la cloroquina aumenta la citotoxicidad de CB21 en cultivo de MCS. Se determinó la viabilidad celular usando la prueba de fosfatasa ácida. Obsérvese que se observaron niveles de fondo de actividad de fosfatasa ácida en cultivos de MCS de HCT116 que no contenían células viables (generalmente ~30%), probablemente debido a atrapamiento enzimático.

Las figuras 6a-6e ilustran que CB21 induce una respuesta de p53 e hipoxia. Figura 6a: Se analizaron los perfiles de expresión génica inducidos por CB21 mediante microalineamientos Affymetrix y se muestra la representación de genes asociados con hipoxia, redes de p53 y mitosis. Figura 6b: Análisis de p53 y HIF-1a mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se trataron células HCT116 con CB21 6 μ M durante los tiempos indicados. Figura 6c: Inducción de un indicador de GFP del controlador del promotor de HIF-1a por CB21. Figura 6d: Inducción de BNIP3 por CB21 en células HCT116 y hTERT-RPE1. Figura 6e: El silenciamiento de BNIP3 no afecta a la muerte celular inducida por CB21. Se transfectaron células HCT116 con ARNip para BNIP3 o ARNip de control y se trataron con CB21 6,25 μ M tras 24 horas. Se determinó la viabilidad tras 48 horas usando el ensayo de fosfatasa ácida.

Las figuras 7a-7d ilustran que CB21 reduce la respiración e inhibe mTOR. Figura 7a: Efecto sobre el transporte de glucosa. Figura 7b: CB21 reduce el consumo de oxígeno. Figura 7c: CB21 reduce la hipoxia en MCS de HCT116. Se trataron MCS de HCT116 tal como se indica y se procesaron para determinar la inmunohistoquímica de pimonidazol. Obsérvese que CB21 reduce la tinción de área positiva para aductos de pimonidazol (< 10 mm de Hg O₂). Figura 7d: CB21 inhibe la fosforilación de 4EBP1. Se trataron células HCT116 con CB21 durante los tiempos indicados y se procesaron extractos de proteína para inmunotransferencia de tipo Western. Debe observarse la reducción en la fosforilación de 4EBP1 y la inducción de fosforilación de AKT.

Las figuras 8a-8c ilustran que la citotoxicidad de CB21 se potencia mediante inanición de glucosa. Figura 8a: Morfología de MCS de HCT116 tras incubación en presencia o ausencia de glucosa durante 24 horas. Figura 8b: Se trataron células monocapa HCT116 con diferentes concentraciones de CB21 en medio que contenía glucosa o libre de glucosa. Se determinaron los niveles de K18 escindida por caspasa usando ELISA M30 CytoDeath. Figura 8c: Se trataron células monocapa HCT116 como en la figura 8b. Se determinó la viabilidad usando el ensayo de fosfatasa ácida.

Descripción de realizaciones preferidas

Materiales y métodos

El compuesto de la invención se obtuvo a partir de bibliotecas de compuestos. Puede prepararse según métodos descritos en la bibliografía, tal como en el documento WO 02/089809, o mediante sus modificaciones no inventivas. El compuesto se disolvió en DMSO. Se alcanzó una concentración final de DMSO al 0,5% en cultivos celulares.

Cultivo celular, generación de MCS y selección. Se mantuvieron células de carcinoma de colon HCT116 en medio modificado de McCoy 5A/suero bovino fetal al 10% a 37°C en el 5% de CO₂. Se prepararon MCS usando una modificación del método descrito previamente (12). Se añadió una suspensión celular que contenía 10.000 células (200 μ l) a cada pocillo de placas de 96 pocillos recubiertas con poli-HEMA. Entonces se sobrellenaron los pocillos añadiendo 170 μ l adicionales de medios para adquirir una curvatura de superficie convexa. Se colocaron separadores de plastilina (3 mm) en las esquinas de cada placa para evitar que las tapas tocasen los medios. Entonces se invirtieron las placas con el fin de permitir que las células sedimentaran en la interfase de líquido/aire y se incubaron con agitación suave. Tras 24 h de incubación, se devolvieron las placas a la normalidad. En primer lugar se retiró el medio en exceso mediante aspiración y después los separadores de plastilina. Las placas se incubaron durante 4 días antes del tratamiento con fármaco. Tras 24 horas de tratamiento con fármaco, se añadió NP40 al medio de cultivo hasta una concentración del 0,1% para extraer K18 escindida por caspasa de MCS y para incluir material liberado al medio a partir de células muertas. Se determinó la queratina-18 escindida por caspasa (K18-Asp396) usando 25 ml de medio/extracto usando el ensayo ELISA M30 CytoDeath (una variante del ELISA M30-Apoptosense® (13) desarrollado para uso *in vitro* (Peviva AB, Bromma, Suecia)).

Se realizaron mediciones de viabilidad mediante el método de fosfatasa ácida (APH) descrito por Friedrich *et al.* (14). Se restó la actividad de fondo.

Se obtuvieron células hTERT-RPE1 de Clontech Laboratories, Mountain Vista, CA. hTERT-RPE1 es una línea de células epiteliales retinianas humanas inmortalizada que expresó de manera estable telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT).

Evaluación de síntesis de ADN. Se usó el sistema de microscopio de fluorescencia ArrayScan V HCS (Cellomics Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.) para determinar la incorporación de EdU. Antes de la adición de compuestos de prueba, se sembraron células HCT116 en placas de 96 pocillos (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA, EE.UU.) y se dejó

que se unieran durante la noche. Se trataron las células con CB21 durante 24 h o con control de vehículo. Se tiñeron las células usando el ensayo Click-iT EdU HCS (C10354, Invitrogen, Molecular Probes Inc, OR, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Se cargaron las placas procesadas en el dispositivo ArrayScan y se analizaron. Se adquirieron imágenes para cada canal de fluorescencia, usando filtros adecuados con objetivo 10x y en cada pocillo se analizaron al menos 1000 células. Se midió la intensidad total promedio en el canal BdU. Se muestran los resultados como promedio de dos experimentos independientes, cada uno realizado en pocillos duplicados y se muestran como media \pm DE.

Ensayos inmunológicos. Se fijaron en paraformaldehído MCS producidos por el método de gota pendiente en placas de 96 pocillos, se deshidrataron, se incrustaron en parafina y se seccionaron. Cada muestra contenía 32 MCS (se agruparon MCS de cada placa de 96 pocillos en 3 grupos). Se desparafinaron las secciones con xileno, se rehidrataron y se calentaron en microondas, y después se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios monoclonales diluidos en albúmina sérica bovina al 1% (peso/volumen) y se visualizaron mediante técnica de complejo de avidina-biotina-peroxidasa convencional (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Se realizó contratinción con hematoxilina de Mayer. Se obtuvo anticuerpo MIB-1 (contra el antígeno Ki67 asociado a proliferación nuclear) de Immunotech SA, Marsella, Francia y se usó a una dilución de 1:150; se obtuvo anticuerpo contra caspasa-3 activa de Pharmingen y se usó a una dilución de 1:50.

Inmunotransferencia de tipo Western. Se resolvieron proteínas de extracto celular mediante geles de Tris-acetato PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transfirieron sobre una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF). Se incubaron las membranas durante la noche con anticuerpos, se lavaron y se incubaron con Ig anti-conejo conjugada con HRP (Amersham Biosciences, Little Chalfont, R.U.) durante 1 h. Se desarrolló la actividad de peroxidasa mediante SuperSignal West Pico (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) según las instrucciones del fabricante.

Connectivity Map. Connectivity Map (CMAP) (www.broad.mit.edu/cmap) versión 02 contiene datos de expresión de todo el genoma para 1300 compuestos (6100 casos, incluyendo réplicas, diferentes dosis y líneas celulares). Se siguió el protocolo original usando células de cáncer de mama MCF-7 tal como se describió por Lamb *et al* (15). Se sembraron las células en placas de 6 pocillos a una densidad de $0,4 \times 10^6$ células por pocillo y se dejó que se unieran durante 24 h, seguido por exposición a NSC76022, NSC620358 o NSC647889 a una concentración final de $10 \mu\text{M}$, o a control de vehículo (DMSO). Tras 6 h de tratamiento, se lavaron las células con PBS. Se preparó ARN total usando el kit RNeasy miniprep (Qiagen, Chatsworth, CA). Empezando a partir de dos microgramos de ARN total, se realizó análisis de expresión génica usando alineamientos Genome U133 Plus 2.0 según el manual técnico de análisis de expresión GeneChip (rev. 5, Affymetrix Inc., Santa Clara, CA). Se normalizaron datos sin procesar con MAS5 (Affymetrix) y se calcularon las razones de expresión génica para células tratadas con fármaco frente a control de vehículo para generar listas de genes regulados. Los criterios de filtro estaban presentes para todos los genes en la línea celular tratada y un punto de corte de expresión de al menos 100 unidades de expresión arbitrarias. Por motivos de compatibilidad con CMAP, sólo se usaron sondas presentes en HG U133A. Para recuperar una lista de compuestos clasificados, se cargaron los 40 genes más regulados por incremento y por disminución (es decir, sondas) para cada compuesto en el CMAP y se compararon con los 6100 casos en la base de datos de CMAP.

Consumo de oxígeno. Se realizó la medición de la respiración tal como se describe (16). Se usaron succinato (5 mM) en presencia de rotenona (2 mM), malato-piruvato (5 mM cada uno) y TMPD ($0,5 \text{ mM}$) + ascorbato (1 mM) como sustratos mitocondriales. Se monitorizaron cambios en la concentración de oxígeno con un electrodo de oxígeno (Hansatech Instruments, Norfolk, R.U.) y se analizaron con el software OxygraphPlus (Hansatech Instruments, Norfolk, R.U.). Se estimó la respiración V4 basal en células en presencia de atracilósido 1 M , que bloquea la entrada de ADP en las mitocondrias.

Tratamiento de xenoinjertos de ratón. Cuando los tumores de HCT116 en ratones SCID habían crecido hasta un tamaño de 200 mm^3 , a los ratones se les inyectaron fármacos por vía i.p., y se midió el tamaño de tumor diariamente.

EJEMPLO 1. *El compuesto de la invención induce apoptosis y reduce la viabilidad de MCS.*

El tratamiento de MCS con CB21 durante 6 h seguido por incubación durante 96 h en medio libre de fármaco dio como resultado MCS de menor tamaño con áreas centrales de necrosis (figura 2a). La inducción de caspasa-3 fue moderada en comparación con NSC647889. De manera importante, el tratamiento de MCS durante 6 horas con CB21 redujo la clonogenicidad hasta $< 5\%$ (figura 2b). La disminución de la clonogenicidad fue más fuerte que la observada para cisplatino, irinotecán y doxorubicina (a pesar del uso de concentraciones de $5 - 10 \mu\text{M}$; > 10 veces las CI_{50} de estos compuestos en cultivos monocapa). El tratamiento de células HCT116 monocapa con CB21 dio como resultado un ligero aumento del número de células entre 0 y 24 h, seguido por pérdida de células (figura 2c). El examen de la incorporación de 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) en células tratadas con CB21 mostró que la síntesis de ADN se anuló casi completamente a las 24 horas (figuras 2d, 2e). CB21 fue igual de eficaz en células en las que el gen supresor de tumores p53 se había alterado que en células que expresaban wtp53 (figura 2b). La respuesta de células epiteliales humanas inmortalizadas (células hTERT-RPE1) difirió de la de células HCT116. El crecimiento de estas células se detuvo, pero el número de células no se redujo (figura 2f). Cuando se sembraron en placa células

hTERT-RPE1 a una densidad elevada (70.000 células/pocillo), no se observó esencialmente ninguna pérdida celular tras el tratamiento con CB21 (figura 2g). Esta diferencia en la respuesta a CB21 entre células HCT116 y hTERT-RPE1 se muestra en la figura 2h.

5 EJEMPLO 2. *El compuesto de la invención es un quelante de hierro que puede penetrar en las células.*

Para generar hipótesis con respecto al mecanismo de acción de CB21, se usó el Connectivity Map (CMap) (15), un compendio de firmas de expresión génica de líneas celulares tratadas con fármaco. Los cambios en la expresión génica provocados por CB21 fueron muy similares a aquellos de ciclopiroxolamina (CPX), un agente antimicótico con capacidad quelante de hierro (17) (figura 3a). Para someter a prueba si la actividad citotóxica de CB21 dependía del agotamiento de hierro, se añadió cloruro de hierro a células HCT116 antes de la adición de CB21. Se encontró que el cloruro de hierro anulaba totalmente el efecto de CB21 (figura 3b), tanto en células HCT116 que expresaban wtp53 como en células HCT116 en las que el gen p53 se había alterado.

15 Se comparó la actividad antiproliferativa de CB21 con la de otros quelantes de hierro conocidos. Se encontró que CB21 era más potente que VLX50, deferasirox, ciclopiroxolamina, deferoxamina (figura 3c). Se examinaron las relaciones de estructura-actividad mediante el uso de varios compuestos estructuralmente relacionados (figuras 3d, 3e). Estos estudios mostraron que CB21 era el compuesto más eficaz tanto en cultivos monocapa como de MCS.

20 EJEMPLO 3. *El compuesto de la invención induce una respuesta autofágica generalizada.*

La actividad antitumorigénica de quelantes de hierro se atribuye generalmente a la inhibición de ribonucleótido reductasa, lo que conduce a la inhibición de proliferación celular (18). Los MCS contienen principalmente células no proliferativas. Por tanto, el hallazgo de la inducción de efectos citotóxicos en MCS mediante el quelante de hierro CB21 fue inesperado. Se estudió/estudiaron el/los mecanismo(s) de acción en más detalle. La inspección visual de células tratadas con CB21 reveló que las células contenían múltiples vesículas citoplasmáticas grandes (figura 4a). Estas vesículas se tiñeron positivamente con un anticuerpo contra la cadena ligera 3 de proteína 1 asociada a microtúbulos (LC3), lo que sugiere que estaban asociadas con autofagia. Se observó tinción de LC3 a las 24 h y fue más fuerte a las 42 h (figura 4b). El análisis de inmunotransferencia de tipo Western mostró que el tratamiento de células monocapa HCT116 con CB21 indujo un fuerte aumento de los niveles tanto de LC3-I como de LC3-II (figura 4c). LC3-II (la forma conjugada con PE de LC3) es un marcador de proteína que se considera que está asociado de manera más fiable con autofagosomas (19). CB21 también indujo fuertemente los niveles de LC3-II en MCS de HCT116 (figura 4c). CB21 también indujo LC3-II en células hTERT-RPE1, pero el nivel de inducción fue mucho más débil en comparación con células HCT116 (figura 4d). Este resultado muestra que el grado de autofagia inducida por CB21 se correlaciona con el efecto citotóxico del compuesto en estos dos tipos de células.

Se trataron células HCT116 con concentraciones citotóxicas de diferentes quelantes de hierro durante 24 h. Se observó inducción de LC3-I y LC3-II en todos los casos, lo que muestra que la inducción de LC3 fue un efecto general de quelantes de hierro (figura 4e). La inducción de LC3-I y II mediante quelantes de hierro fue mucho más fuerte en comparación con la observada tras tratamiento con rapamicina o NVP-BEZ235 (sin inducción observada a las 24 h, inducción débil a las 6 h).

Para el examen de si CB21 puede inducir cambios celulares en las células del núcleo interno de los MCS, se trataron MCS de HCT116 con CB21 durante 6 h, se lavaron y se incubaron durante diferentes periodos de tiempo, se fijaron, se seccionaron y se examinaron mediante microscopía electrónica. Se observaron grandes vesículas en células a partir de las 24 h tras el tratamiento (figura 4f). Concretamente, una característica común de MCS tratados con CB21 era la aparición temprana de mitocondrias agrandadas e hinchadas (figura 4f). De manera más importante, se produjo vacuolización masiva de manera dependiente del tiempo no sólo en células en la periferia de los MCS sino también en el centro de los MCS (figura 4f). Se concluyó que CB21 induce la formación de vesículas en las células de los núcleos centrales de MCS, que se encontró que eran resistentes a la apoptosis, y que esta respuesta estaba asociada con pérdida de viabilidad de estas células.

55 EJEMPLO 4. *El bloqueo de autofagia o fusión de autofagosomas-lisosomas potencia la muerte celular por el compuesto de la invención.*

Generalmente se considera que la autofagia es una respuesta de supervivencia a condiciones de estrés, pero también puede ser un mecanismo de muerte celular programada (20, 21). Para examinar los efectos de diferentes inhibidores de autofagia sobre la muerte celular inducida por CB21, se potenció el efecto citotóxico de CB21 mediante 3-MA (figura 5a), un inhibidor de PI3K usado comúnmente como inhibidor de autofagia. A continuación, se realizó un silenciamiento de Beclin/Atg6 usando ARNip. Esto dio como resultado un silenciamiento casi completo de la expresión de esta proteína. El silenciamiento de Beclin/Atg6 redujo la viabilidad de células HCT116 en ~50%; la viabilidad se redujo adicionalmente mediante la toxicidad de CB21 (figura 5b). El examen del efecto de bafilomicina A, un antibiótico que impide fusiones de autofagosomas y lisosomas, demostró que la bafilomicina A suprime la aparición de vesículas citoplasmáticas grandes positivas para LC3-II en células HCT116 (figura 5c). Mientras que la bafilomicina A indujo citotoxicidad a las ~72 horas, la combinación de citotoxicidad de CB21 y bafilomicina A se observó antes (~48 horas) (figura 5d). Estos hallazgos muestran que la inhibición de autofagia potencia el efecto

citotóxico del compuesto de la invención, y que grandes vesículas observadas en células tratadas con CB21 están provocadas por la fusión de autofagosomas y lisosomas.

5 La cloroquina (CQ) es un agente lisosomotrópico usado ampliamente para inhibir la maduración de autofagosomas para dar autolisosomas degradantes (22). CQ no tiene efecto por sí misma sobre la proliferación de células HCT116. La combinación de CQ y CB21 dio como resultado una fuerte potenciación de la muerte celular en células HCT116 monocapa (figura 5e). El examen de citotoxicidad para MCS de la combinación de CQ y CB21 reveló un efecto potenciado en comparación con el efecto de o bien CQ o bien CB21 sobre MCS (figura 5f).

10 EJEMPLO 5. *La inducción de LC3 no está mediada por BNIP3.*

15 CB21 indujo varios genes sensibles a hipoxia y también varios genes que se sabe que están regulados por p53 (figura 6a). Se confirmó la inducción de niveles de proteína HIF-1a y p53 mediante inmunotransferencia de tipo Western (figura 6b). También se observó una gran inducción usando una línea celular indicadora en la que GFP se regula mediante el promotor de HIF-1a (figura 6c).

20 Entre los diferentes genes fuertemente inducidos por CB21 se observó el gen que codifica para la proteína de sólo BH3, BNIP3. BNIP3 es una diana conocida de HIF-1a (23). Se ha notificado que la expresión de BNIP3 induce autofagia y vacuolización citoplasmática amplia (24). Se encontró que CB21 inducía la expresión de proteína BNIP3 en células HCT116 (figura 6d). Sin embargo, también se indujo fuertemente la expresión de BNIP3 por CB21 en células hTERT-RPE1 (figura 6d). Este hallazgo no es coherente con que BNIP3 sea un supuesto mecanismo de autofagia inducida por CB21. El silenciamiento de BNIP3 usando ARNip no disminuyó la inducción de LC3-II y muerte celular por CB21 (figura 6e).

25 EJEMPLO 6. *El compuesto de la invención inhibe el consumo de oxígeno y disminuye la actividad de mTOR.*

30 Los resultados descritos anteriormente sugieren que la autofagia se induce como intento de rescate de células de ataques tóxicos inducidos por CB21. Puesto que varias proteínas clave implicadas en el metabolismo de energía celular contienen complejos de Fe-S (25), los presentes inventores plantearon la hipótesis de que la quelación de hierro por CB21 puede conducir a alteraciones en el metabolismo celular que desencadenarán autofagia. Para evaluar esta hipótesis, se examinó el efecto de CB21 sobre niveles intracelulares de ATP. Sin embargo, no pudo observarse disminución de los niveles de ATP intercelular a concentraciones que inducen autofagia ni tampoco pudo detectarse una inducción de la fosforilación de AMPK (proteína cinasa activada por AMP) (no mostrado). A continuación, se siguió una posible afectación de transporte de glucosa por CB21 mediante citometría de flujo usando el análogo de d-glucosa fluorescente 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-amino]-2-desoxi-d-glucosa (2-NBDG). Tal como se muestra en la figura 7a, se observó un aumento de ~25% de la captación de 2-NBDG en células tratadas con CB21.

40 El examen del efecto de CB21 sobre el consumo de oxígeno celular reveló que en cultivos monocapa de HCT116, la respiración V3 (estado 3) y Vu (sin acoplar) disminuyó significativamente ($p < 0,05$) tras 6 horas de tratamiento con CB21 (figura 7b). Para examinar si la respiración en células tumorales en los MCS se ve afectada por CB21, se usó un enfoque indirecto. Se sabe que la inhibición de la respiración mitocondrial conduce a tensión de oxígeno en el tejido aumentada, que puede visualizarse como tinción de pimonidazol disminuida (26). Se encontró efectivamente que el área de tinción de MCS seccionada positiva con pimonidazol era ~50% del control en MCS tratados con CB21 (figura 6C; tabla). Se observó el efecto después de 3 horas de exposición al fármaco y persistió a las 24 horas (figura 7c). Como control, se trataron cultivos monocapa de HCT116 con el agente de desacoplamiento mitocondrial carbonilcianuro-3-clorofenilhidrazona, CCCP, que se sabe que aumenta el consumo de oxígeno. Tal como se esperaba, los MCS tratados con CCCP presentaron una mayor área de tinción con pimonidazol (figura 7c; tabla).

50 Tabla. Cuantificación de tinción con pimonidazol de esteroides

Muestra	Conc.	Tiempo/h	Área positiva para pimonidazol (%)	D.E.
Control			63	13,0
CB21	6,25 μ M	3	31,8	4,0
Rapamicina	10 nM	5	42,2	5,2
CCCP	10 mM	6	79,9	4,3

55 La diana de mamífero de rapamicina (mTOR) es una serina/treonina cinasa que regula el crecimiento celular en respuesta al estado de nutrientes. Está bien establecido que el estrés metabólico afecta a la actividad de la ruta de mTOR (27). La ruta de mTOR regula el consumo de oxígeno mitocondrial y la capacidad oxidativa (28, 29). Con el fin de determinar si el consumo de oxígeno disminuido observado tras el tratamiento con CB21 estaba asociado con la inhibición de mTOR, se examinó la fosforilación del sustrato de mTOR, 4EBP1. Tal como se muestra en la figura 7D, la fosforilación de 4EBP1 se inhibe por CB21. La disminución de la fosforilación está asociada con una fosforilación de AKT aumentada. Se sabe que la inhibición de mTORC1 libera un bucle de realimentación negativo que implica, da como resultado una fuerte activación de Akt (30). Para someter a prueba si la inhibición de mTOR

reducía el consumo de oxígeno, se trató MCS de HCT116 con rapamicina (un inhibidor farmacológico específico de la formación de complejo mTOR-raptor) y se tiñeron secciones con pimonidazol. Se observó una reducción de tinción con pimonidazol, aunque no tan fuerte como con CB21 (figura 7c; tabla 1).

5 Estos hallazgos fomentaron el examen de si la inhibición directa de mTOR conducía a efectos similares a los de CB21. Para estos experimentos se usó el inhibidor de PI3K/mTOR dual, NVP-BEZ235, un compuesto en ensayos clínicos. De manera importante, se encontró que NVP-BEZ235 disminuía la fosforilación de 4EBP1 en células HCT116 que se hicieron crecer tanto en condiciones de monocapa como de MCS (figura 7d). A diferencia de CB21, NBPBEZ235 no afectó a la viabilidad de las células en el núcleo de los MCS.

10 EJEMPLO 7. *La muerte celular inducida por el compuesto de la invención se potencia mediante inanición de glucosa*

Aproximadamente el 50% de la producción de ATP celular en células tumorales es mediante fosforilación oxidativa (31). Se ha notificado que el consumo de oxígeno disminuye en las regiones interiores de MCS tumorales, posiblemente como consecuencia de actividad proliferativa disminuida (32, 33). Otros investigadores han encontrado que el consumo de oxígeno es más bien uniforme en regiones viables de MCS (34); se ha notificado que clones de fibroblastos en la misma fase de transformación pueden tener actividad metabólica bastante distinta en cultivo de MCS (33). Incluso en el caso de consumo de oxígeno celular bajo en las células de el núcleo central, se espera que una disminución adicional inducida por CB21 conduzca a una dependencia de glucosa aumentada. Mientras que las células monocapa pueden compensar la dependencia de glucosa aumentada mediante captación aumentada (tal como se muestra en la figura 8a), la glucosa será limitante en MCS. Tal como se muestra en la figura 8a, las células del núcleo de MCS de HCT116 dependen de glucosa para la supervivencia: el agotamiento de glucosa conduce a necrosis de áreas centrales, un efecto que es reminiscente del de CB21 (figura 2). Basándose en estas consideraciones, se sometió a prueba si la inanición de glucosa aumenta la sensibilidad de células monocapa HCT116 frente a CB21. Efectivamente este fue el caso: la inanición de glucosa disminuyó la viabilidad celular y aumentó la apoptosis por CB21. Es probable que estos hallazgos expliquen, al menos en parte, la sensibilidad de células del núcleo central frente a CB21.

EJEMPLO 8. *Actividad antitumoral del compuesto de la invención*

30 Se examinó la actividad antitumoral *in vivo* por CB21 en el modelo de HCT116. Se permitió que los tumores crecieran hasta un tamaño de ~0,2 ml y luego se trataron con CB21. Se observó un efecto antitumoral evidente del compuesto CB21 (figura 1).

35 Se han desarrollado varios quelantes de hierro que presentan actividad antitumoral, incluyendo Triapine (35), Tachpyr (36) y Trensox (37). El hierro es importante para muchas reacciones metabólicas, incluyendo la formación de desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos mediante ribonucleótido reductasa (38). En ausencia de Fe, las células no pueden avanzar de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, lo que explica la acción antiproliferativa de CB21 observada tanto en células HCT116 como hTERT-RPE1. Puesto que los quelantes de hierro se consideran principalmente específicos para las células proliferantes, no se anticipó la identificación de un quelante de hierro en una selección para agentes que muestran citotoxicidad en MCS. Investigaciones adicionales revelaron posibles mecanismos para los efectos de CB21 sobre células no proliferativas en núcleos de MCS. Se encontró además que CB21 disminuyó el consumo de oxígeno de células HCT116 y hTERT-RPE1, tal como se observó tanto mediante medición directa como usando tinción con pimonidazol de MCS. Se sabe que el consumo de oxígeno mitocondrial y la capacidad oxidativa está regulado por la ruta de mTOR (28, 29). También se ha notificado que el quelante de hierro deferasirox inhibe la señalización de mTOR (39). Se encontró efectivamente que CB21 inhibía la fosforilación de 4EBP1 y conducía a una fosforilación de AKT regulada por incremento. La inhibición de la señalización de mTOR mediante deferasirox se ha asociado a inducción de REDD1 (también denominado RTP801), un gen inducido por hipoxia, que a su vez activa la proteína TSC2 (40). Es concebible que el efecto de CB21 sobre el consumo de oxígeno esté mediado, al menos en parte, por este mecanismo. Otra posibilidad es que el estrés metabólico inducido por agotamiento de hierro afecte a la actividad de la ruta de mTOR mediante algún otro mecanismo.

Otro efecto de CB21, compartido por otros quelantes de hierro (41), es la inducción de vesículas citoplasmáticas positivas para LC3 y proteína LC3-II. Se encontró que la inducción de LC3 estaba mucho menos pronunciada en células hTERT-RPE1. La inducción de LC3-II por quelantes de hierro era significativamente más fuerte que la observada con inhibidores de mTOR, lo que sugiere que la inducción de LC3-II no estaba mediada exclusivamente mediante la inhibición de mTOR. Se encontró que el inhibidor de PI3K/mTOR, NVP-BEZ235, no induce efectos citotóxicos detectables sobre células en núcleos de HCT116 (Hernlund *et al.*, no publicado), lo que sugiere de nuevo que la inhibición de mTOR no es el único factor responsable de la inducción de autofagia y muerte celular por CB21.

60 El consumo de oxígeno disminuido observado tras el tratamiento con CB21 debe conducir a una dependencia de glucosa aumentada para la producción de ATP, de manera similar a lo que se ha notificado para rapamicina (42). Esta propuesta parece confirmarse mediante la observación de que la población de células presentes en el núcleo de MCS mostró signos de estrés de ER constitutivo (positivo para Grp78), una condición inducida probablemente por hipoxia y suministro de glucosa limitado. La inanición de glucosa de MCS indujo muerte celular de las células del núcleo, coherente con el concepto de que la supervivencia de esta población celular depende de glucosa. La

dependencia de glucosa aumentada observada tras el tratamiento con CB21 contribuye muy probablemente a la muerte celular de la población de células del núcleo. La apoptosis no pareció ser el principal mecanismo de muerte celular por CB21, tal como se evidenció mediante la inducción débil de caspasa-3 en comparación con la inducción fuerte de caspasa-3 en células periféricas (no mostrado). Las condiciones de estado de energía celular escaso pueden conducir a resistencia a apoptosis (lo que también explica la resistencia de células del núcleo a apoptosis inducida por NSC647889 (no mostrado)). Parece que CB21 induce dependencia de glucosa aumentada de células HCT116, y que esto conduce a viabilidad disminuida de células hipóxicas en núcleos de MCS.

La autofagia es una respuesta de degradación catabólica frente al estrés metabólico, que procura mantener la homeostasis a través de la degradación de proteínas y orgánulos. PI3K-Akt-mTOR, LKB1-AMPK-mTOR y p53 son los reguladores principales de la ruta autofágica. Se cree que la autofagia está implicada en la mediación de la resistencia de células cancerosas a la terapia anticancerígena y que es una diana terapéutica atractiva en la resistencia a fármacos anticancerígenos (20, 43). CB21 indujo una respuesta autofágica notable, caracterizada por una fuerte inducción de LC3-I y II. La presente invención revela la inhibición de autofagia para potenciar la citotoxicidad de CB21.

Bibliografía

1. Tannock IF *et al.* Limited penetration of anticancer drugs through tumour tissue: a potential cause of resistance of solid tumours to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2002; 8:878-84.

2. Sutherland RM y Durand RE. Radiation response of multicell spheroids - an in vitro tumour model. *Curr Top Radiat Res Q* 1976; 11:87-139.

3. Mueller-Klieser W. Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *J Cancer Res Clin Oncol* 1987; 113:101-22.

4. Zietarska M *et al.* Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC). *Mol Carcinog* 2007; 46:872-85.

5. Smalley KS *et al.* Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2006; 42:242-7.

6. Frankel A. *et al.* Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumour spheroids. *Cancer Res* 1997; 57:2388-93.

7. Levine B. Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* 2007;446:745-7.

8. Degenhardt K *et al.* Autophagy promotes tumour cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumourigenesis. *Cancer Cell* 2006;10:51-64.

9. Karantza-Wadsworth V *et al.* Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumourigenesis. *Genes Dev* 2007;21:1621-35.

10. Mizushima N *et al.* Autophagy fights disease through cellular selfdigestion. *Nature* 2008;451:1069-75.

11. Edinger AL y Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16:663-9.

12. Herrmann R *et al.* Screening for compounds that induce apoptosis of cancer cells grown as multicellular spheroids. *J Biomol Screen* 2008; 13:1-8.

13. Hägg M *et al.* A novel high-through-put assay for screening of pro-apoptotic drugs. *Invest New Drugs* 2002; 20:253-9.

14. Friedrich J *et al.* A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *J Biomol Screen* 2007; 12:925-37.

15. Schmidt-Mende J *et al.* Early mitochondrial alterations in ATRA-induced cell death. *Cell Death Differ* 2006; 13:119-28.

16. Lamb J *et al.* The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 2006; 313:1929-35.

17. Linden T *et al.* The antimycotic ciclopiroxolamine induces HIF-1alpha stability, VEGF expression, and angiogenesis. *FASEB J* 2003; 17:761-3.

18. Yu Y *et al.* Chelators at the cancer coalface: desferrioxamine to Triapine and beyond. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6876-83.
- 5 19. Klionsky DJ *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008; 4:151-75.
20. Amaravadi RK y Thompson CB. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2007; 13:7271-9.
- 10 21. Mazure NM y Pouyssegur J. Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr Opin Cell Biol* 2009.
22. Lum JJ *et al.* Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 005; 120:237-48.
- 15 23. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:9082-7.
24. Vande Velde C *et al.* BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol* 2000; 20:5454-68.
- 20 25. Tong WH y Rouault TA. Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron-sulfur cluster biogenesis. *Biomaterials* 2007; 20:549-64.
- 25 26. Arteel GE *et al.* Reductive metabolism of the hypoxia marker pimonidazole is regulated by oxygen tension independent of the pyridine nucleotide redox state. *Eur J Biochem* 1998; 253:743-50.
27. Corradetti MN *et al.* Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev* 2004; 18:1533-8.
- 30 28. Schieke SM *et al.* The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem* 2006; 281:27643-52.
29. Cunningham JT *et al.* mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 2007; 450:736-40.
- 35 30. Carracedo A y Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 2008; 27:5527-41.
- 40 31. Sariban-Sohraby S *et al.* Comparison of energy metabolism in human normal and neoplastic (Burkitt's lymphoma) lymphoid cells. *Cancer Res* 1983; 43:4662-4.
32. Freyer JP *et al.* In situ oxygen consumption rates of cells in V-79 multicellular spheroids during growth. *J Cell Physiol* 1984; 118:53-61.
- 45 33. Kunz LA *et al.* Oncogene-associated growth behavior and oxygenation of multicellular spheroids from rat embryo fibroblasts. *Adv Exp Med Biol* 1994; 345:359-66.
34. Bredel-Geissler A *et al.* Proliferation-associated oxygen consumption and morphology of tumour cells in monolayer and spheroid culture. *J Cell Physiol* 1992; 153:44-52.
- 50 35. Finch RA *et al.* Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumour activity. *Biochem Pharmacol* 2000; 59:983-91.
- 55 36. Torti SV *et al.* Tumour cell cytotoxicity of a novel metal chelator. *Blood* 1998; 92:1384-9.
37. Rakba N *et al.* Antiproliferative and apoptotic effects of O-Trensox, a new synthetic iron chelator, on differentiated human hepatoma cell lines. *Carcinogenesis* 2000; 21:943-51.
- 60 38. Richardson DR. Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 42:267-81.
39. Ohyashiki JH *et al.* The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer Sci* 2009; 100:970-7.
- 65 40. Wang H *et al.* Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by

enhancing expression of REDD1. J Biol Chem 2006; 281:39128-34.

41. Tracy K *et al.* BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. Mol Cell Biol 2007; 27:6229-42.

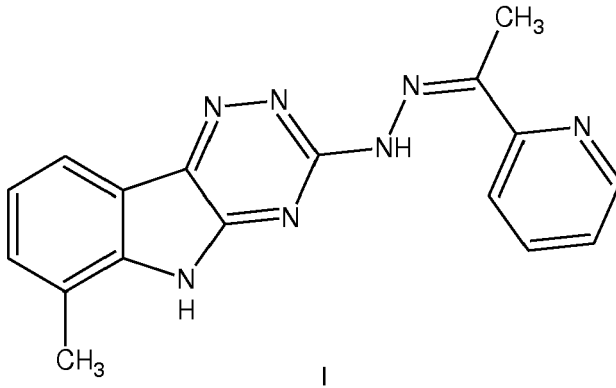
5 42. Ramanathan A y Schreiber SL. Direct control of mitochondrial function by mTOR. Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106:22229-32

10 43. Degtyarev M *et al.* Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumours to lysosomotropic agents. J Cell Biol 2008; 183:101-16.

44. Eshba *et al.* Synthesis of some substituted-1,2,4-triazino[5,6-b]indole derivatives as potential antiviral and anticancer agents. Pharmazie vol. 42, n.º 10, 1987; 664-666.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Compuesto de fórmula I para su uso en el tratamiento de un tumor canceroso sólido en una persona, en el que el compuesto es N-(1-piridin-2-il-metiliden)-N-(9H-1,3,4,9-tetraaza-fluoren-2-il)-hidrazina o una sal o complejo farmacéuticamente aceptables de la misma.



- 10 2. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un tumor canceroso sólido en una persona que comprende o que consiste en el compuesto según la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente adecuado.
- 15 3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, que comprende una dosis eficaz para combatir el cáncer de dicho compuesto.

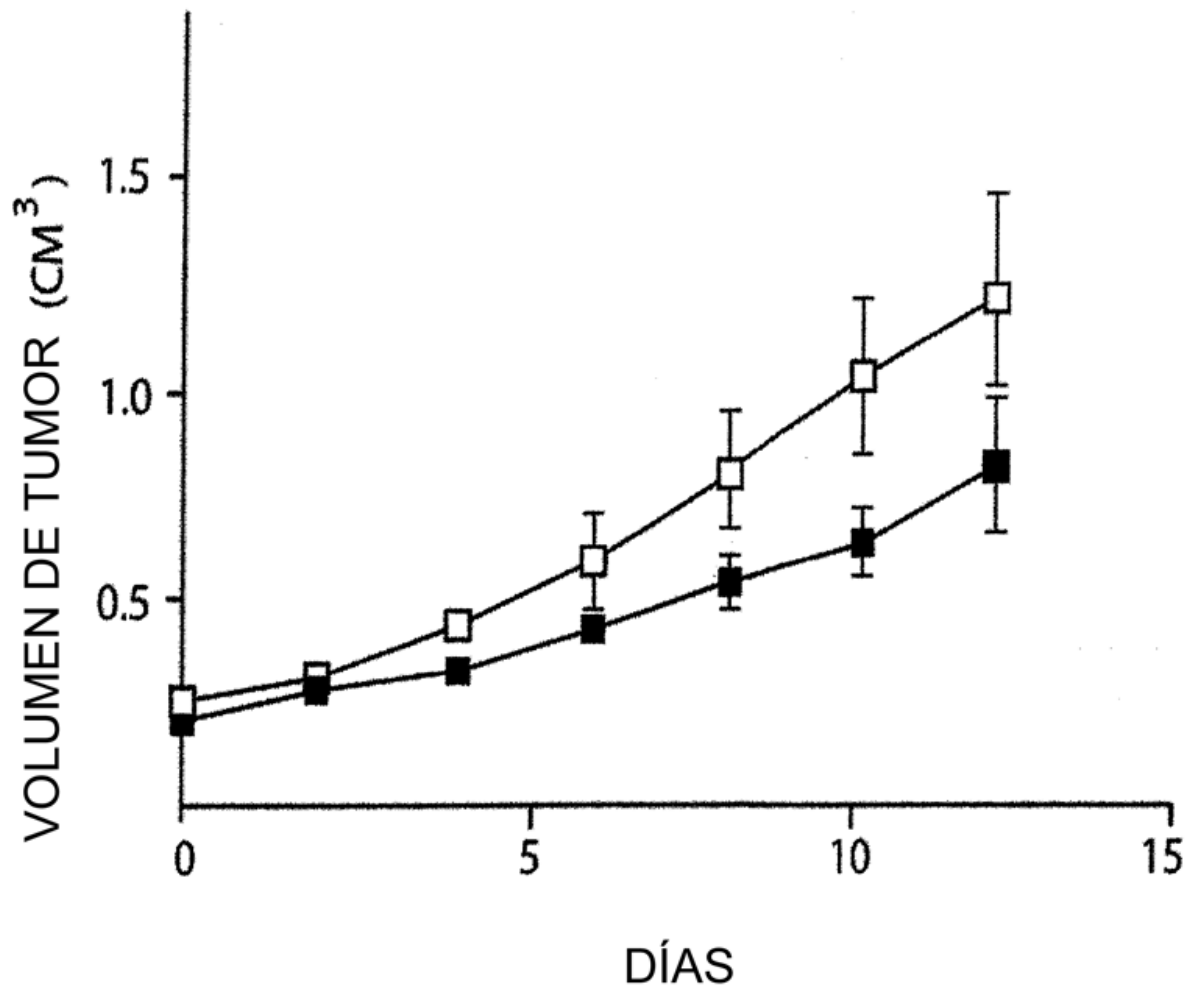


Fig. 1

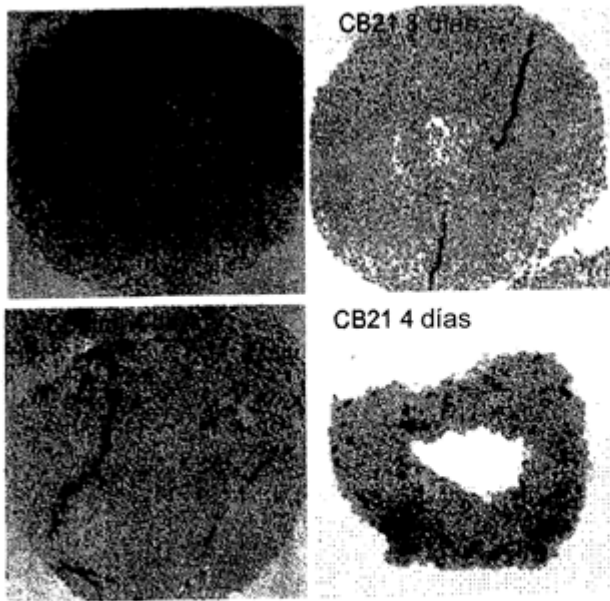


Fig. 2a

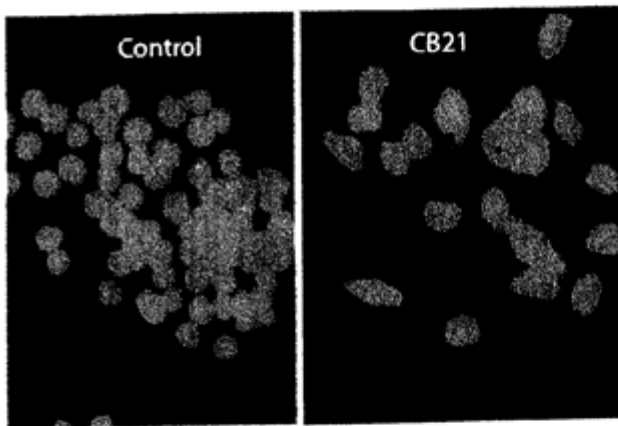


Fig. 2d

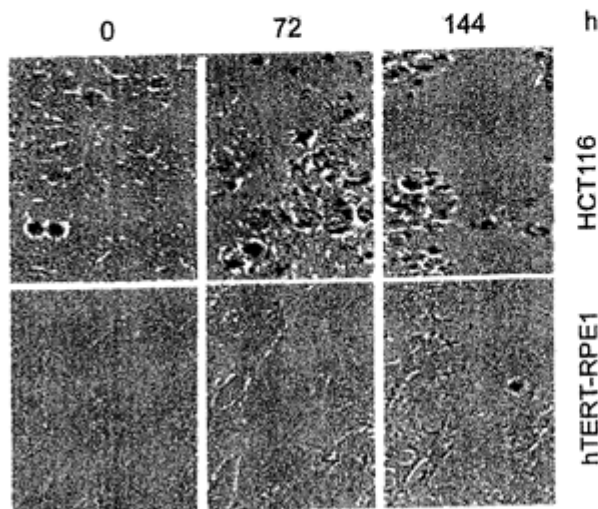


Fig. 2h

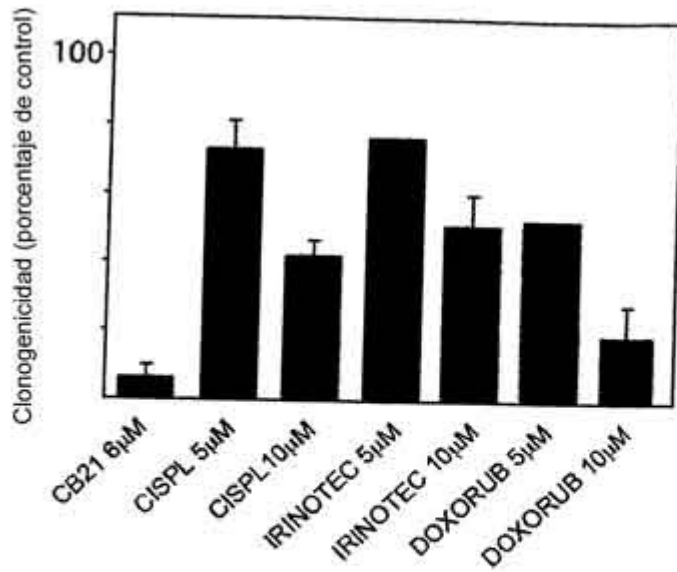


Fig. 2b

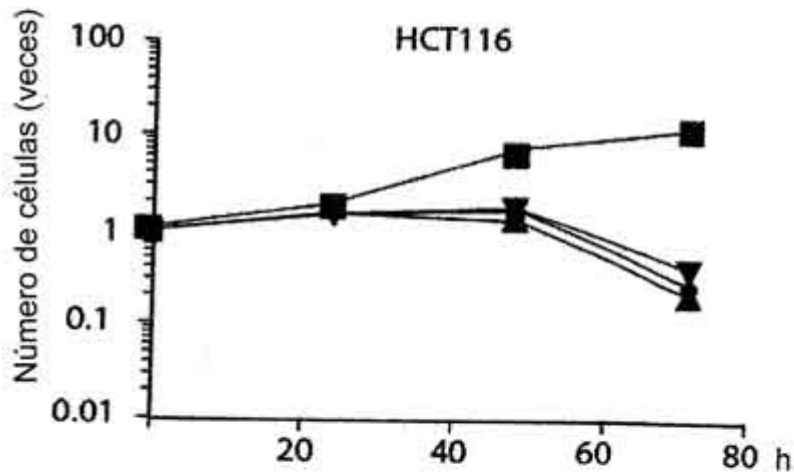


Fig. 2c

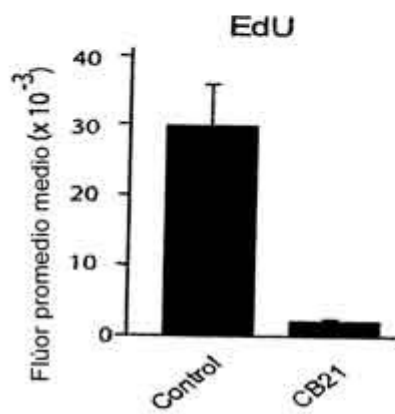


Fig. 2e

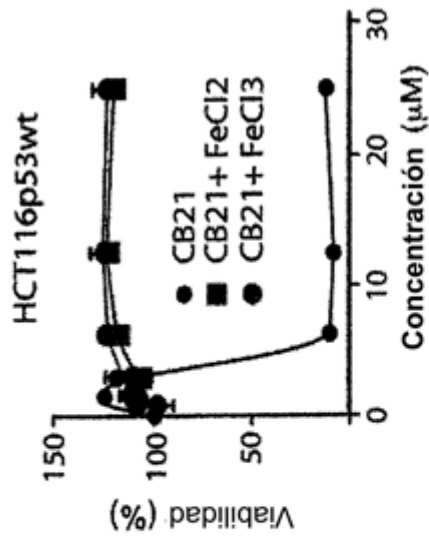


Fig. 3b

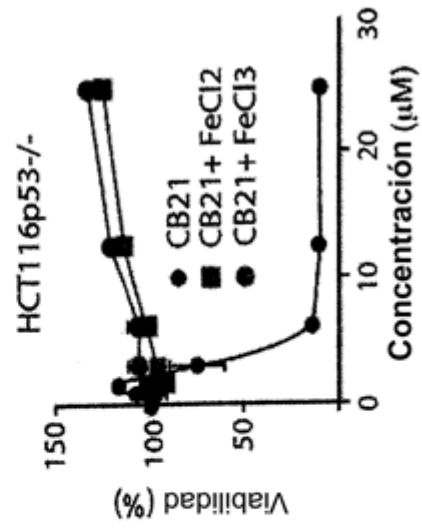


Fig. 3b'

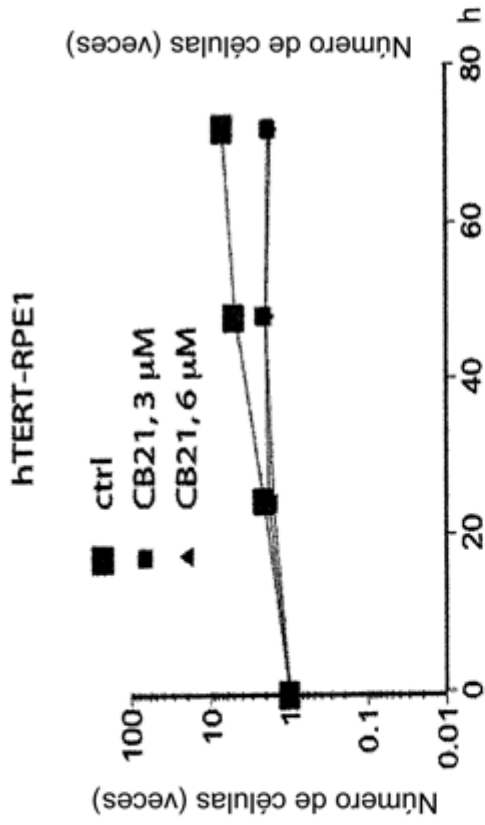


Fig. 2f

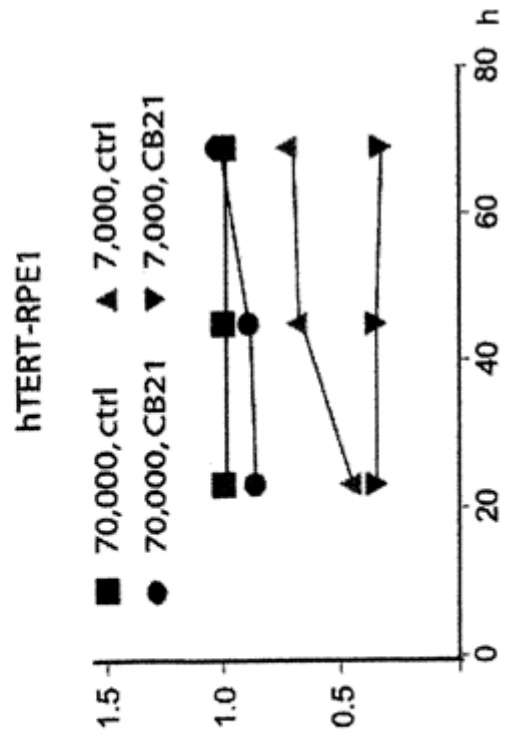


Fig. 2g

CLASIF.	AGENTE	CÉLULA	PUNT.
1	CICLOPIROX	MCF-7	1
2	5109870	MCF-7	.999
3	CICLOPIROX	MCF-7	.957
4	DEFEROXAMINA	MCF-7	.773
5	CICLOPIROX	PC-3	.715
6	RESVERATROL	MCF-7	.691
7	MONOBENZONA	MCF-7	.685
8	DEFEROXAMINA	MCF-7	.663

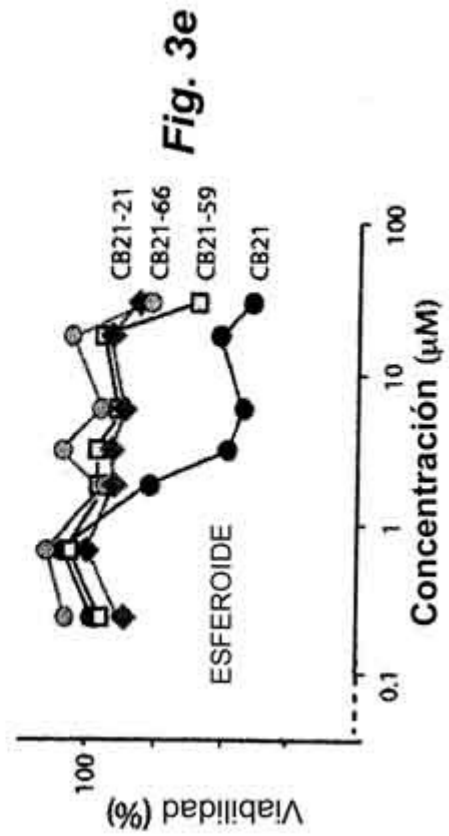
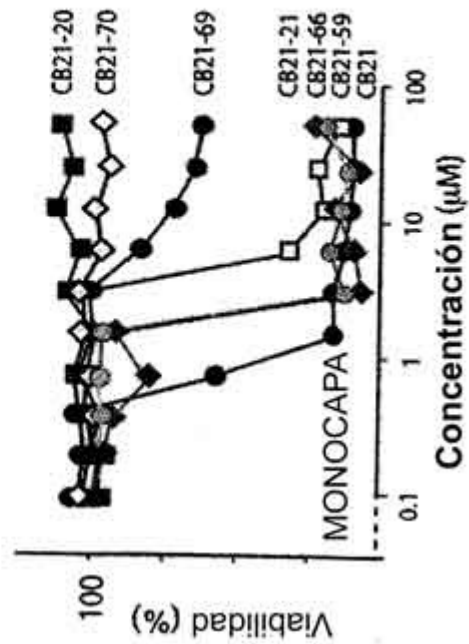
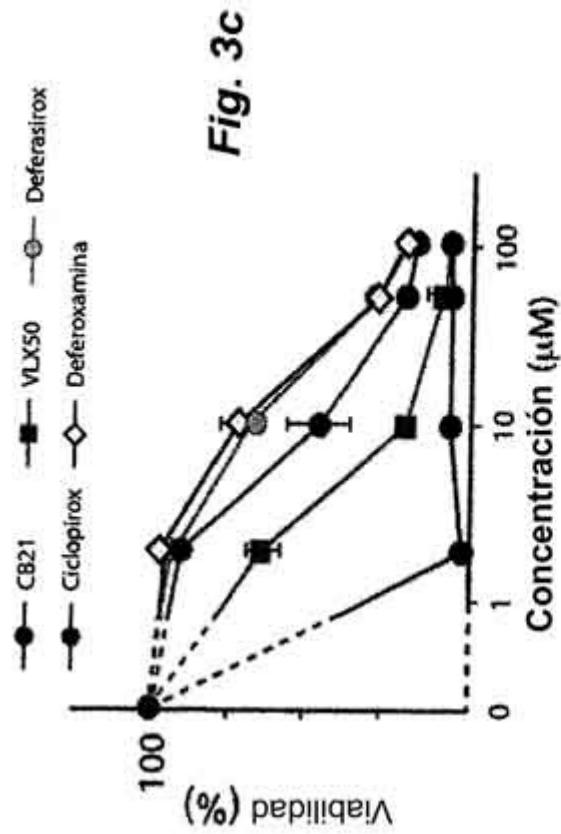


Fig. 3d

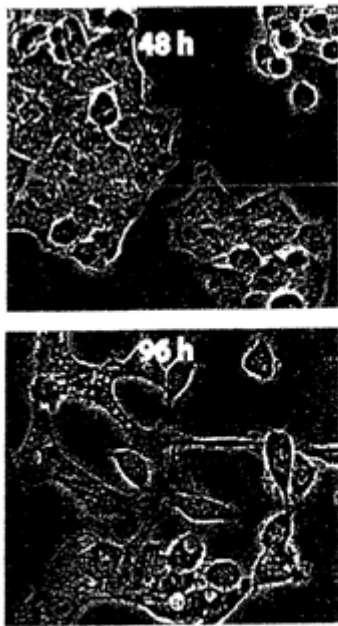


Fig. 4a

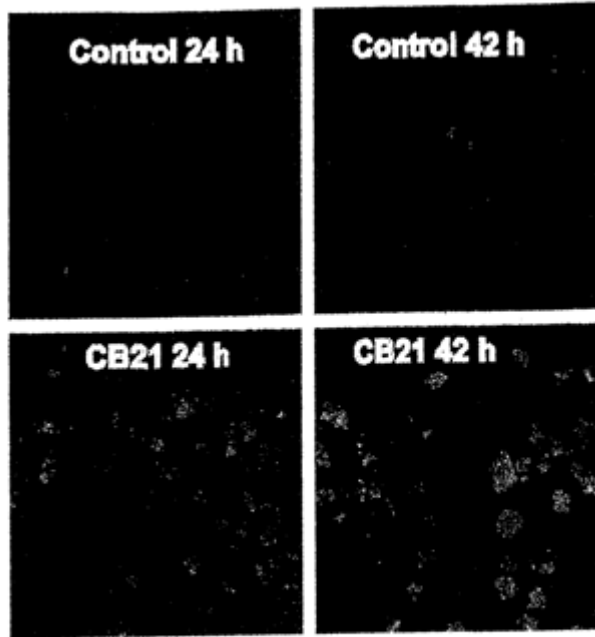


Fig. 4b

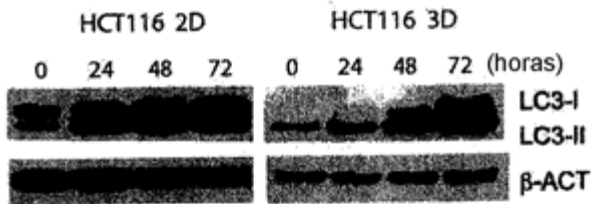


Fig. 4c

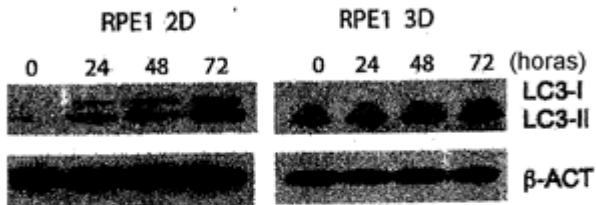


Fig. 4d

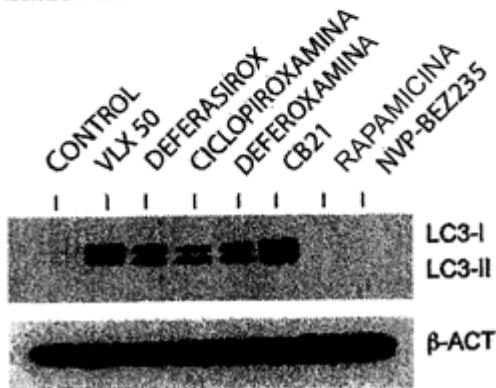


Fig. 4e

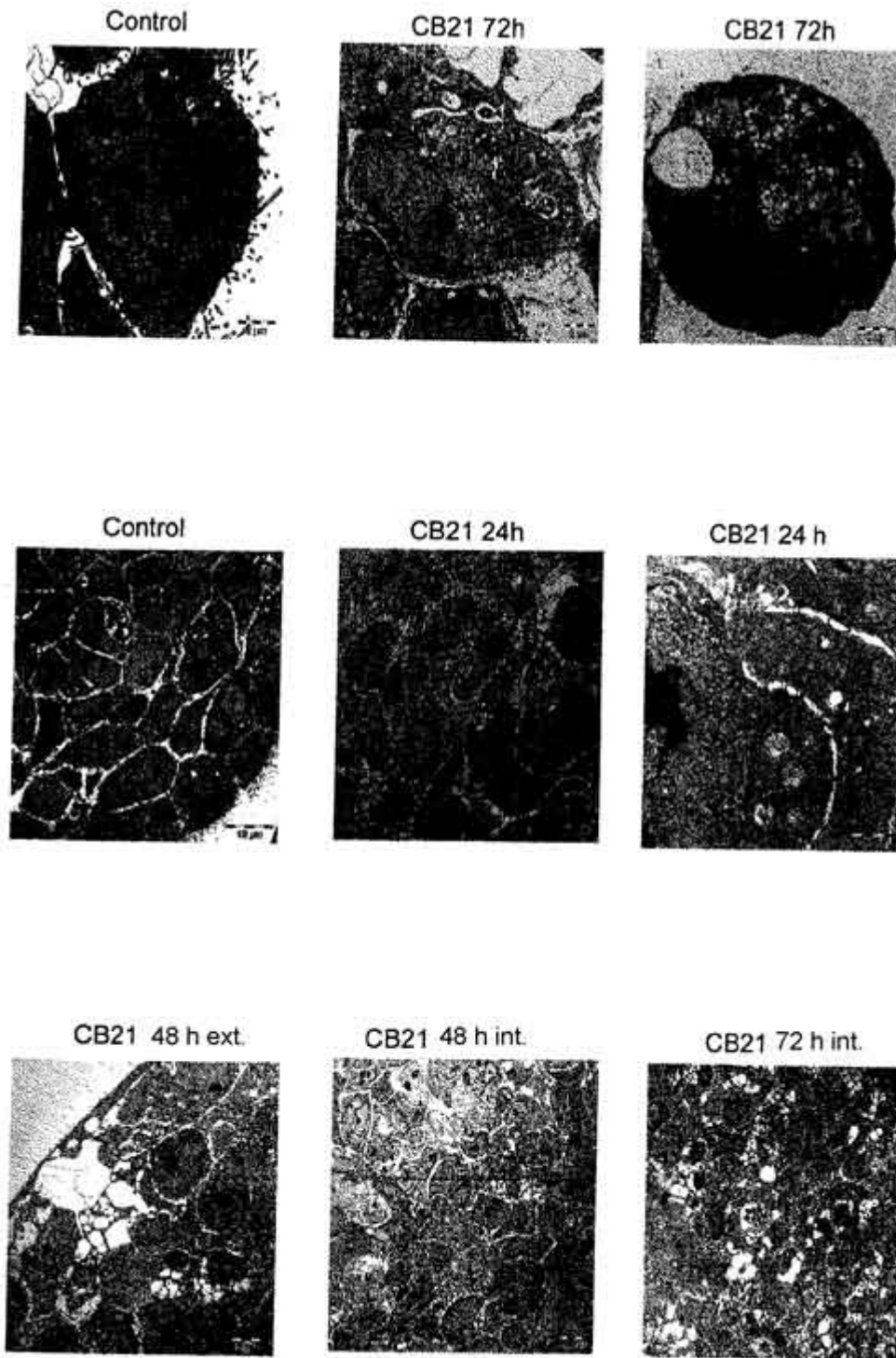


Fig. 4f

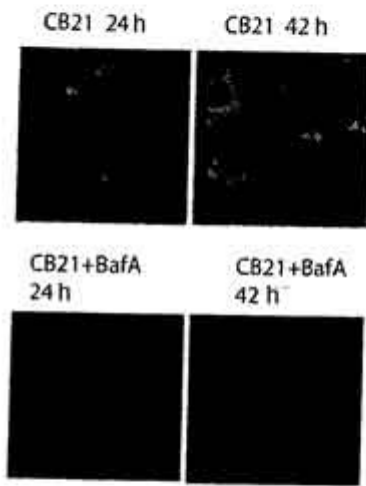
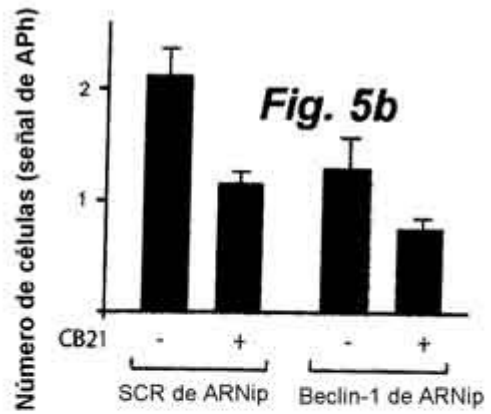
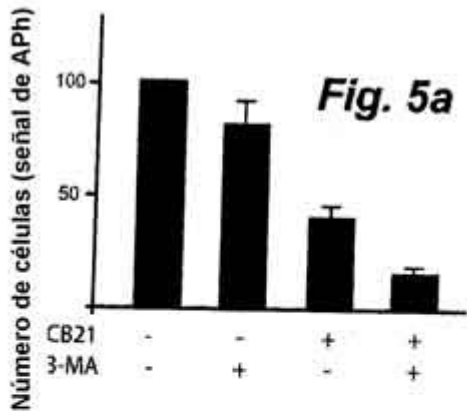


Fig. 5c

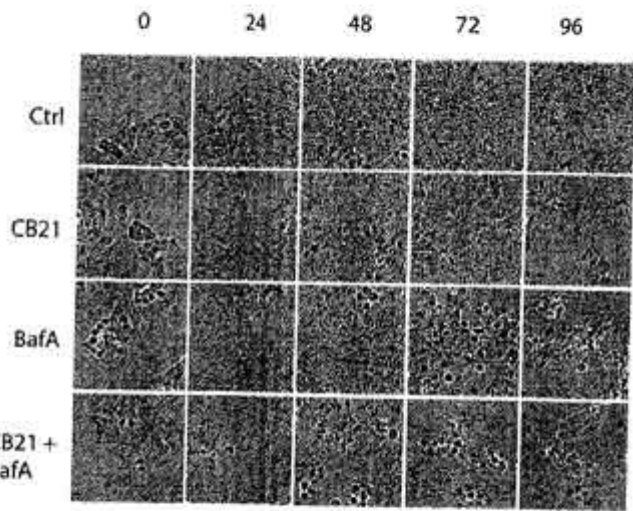


Fig. 5d

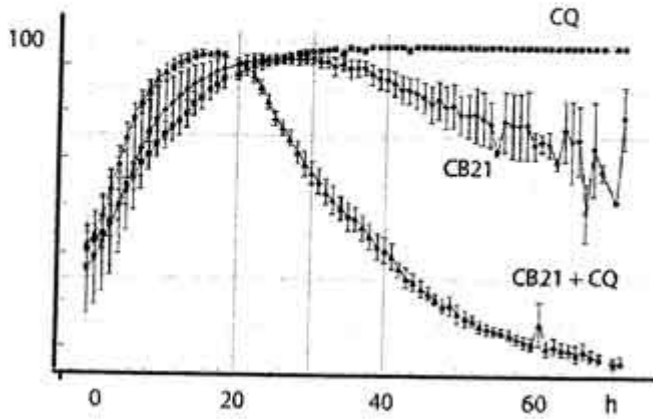


Fig. 5e

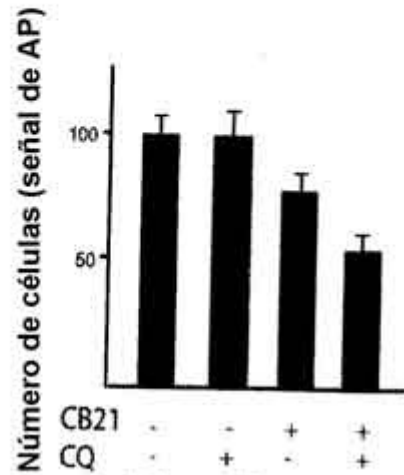


Fig. 5f

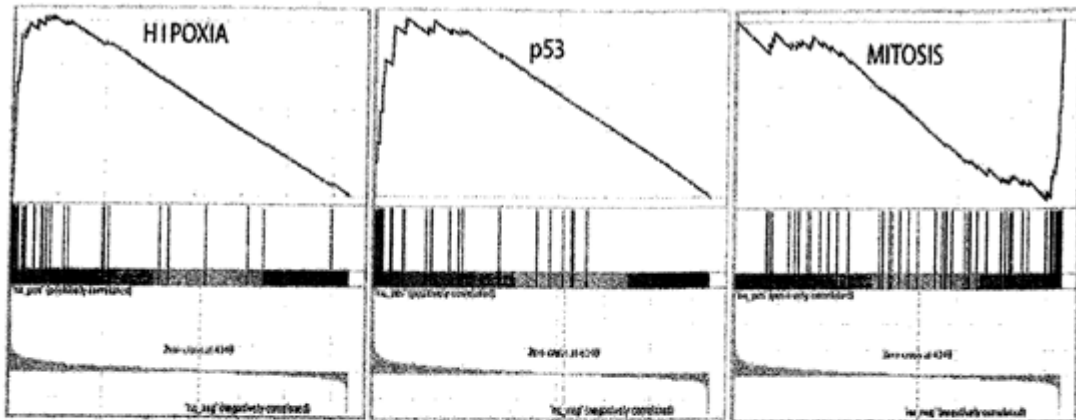


Fig. 6a

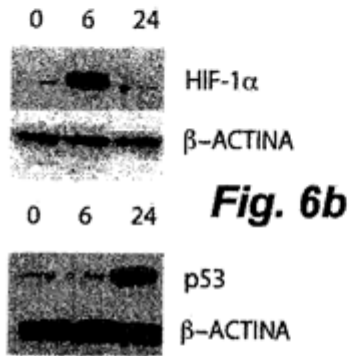


Fig. 6b

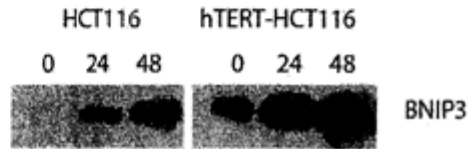


Fig. 6d

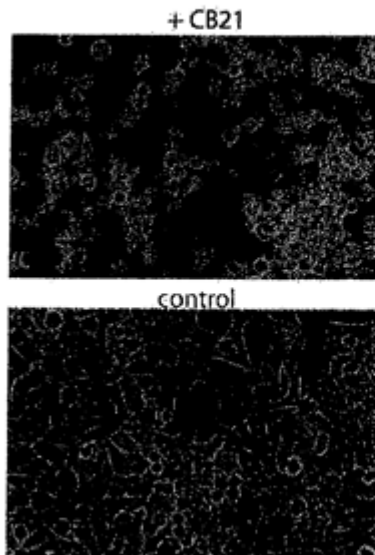


Fig. 6c

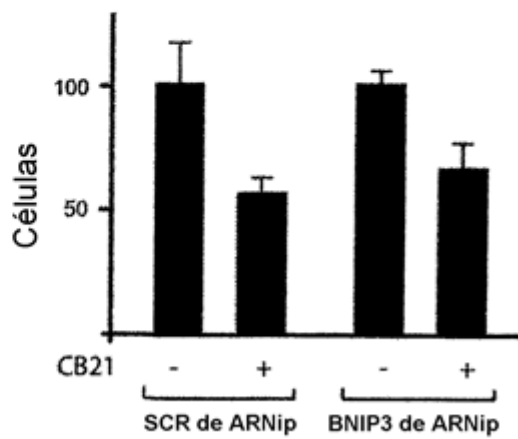


Fig. 6e

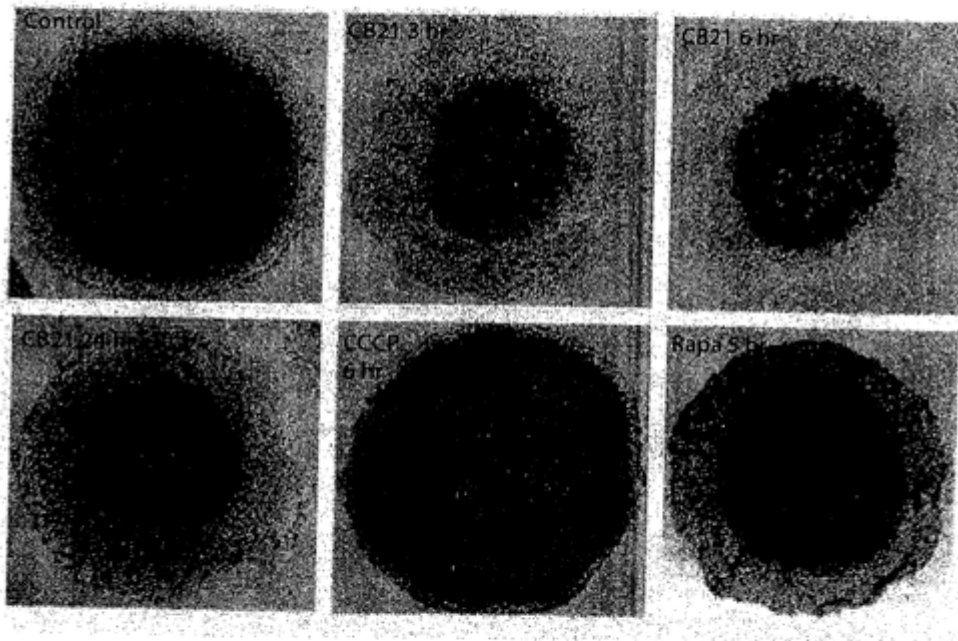
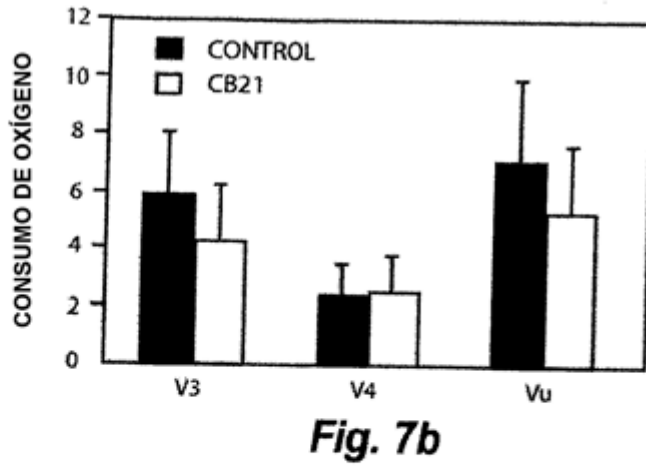
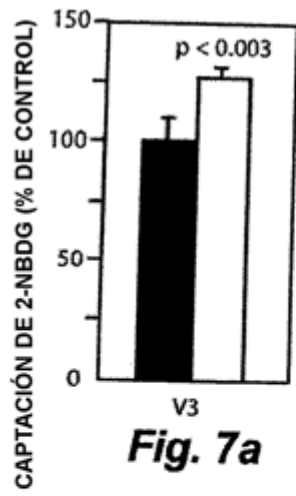


Fig. 7c

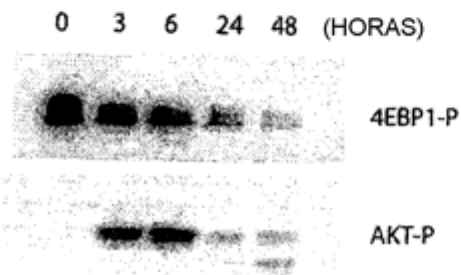


Fig. 7d

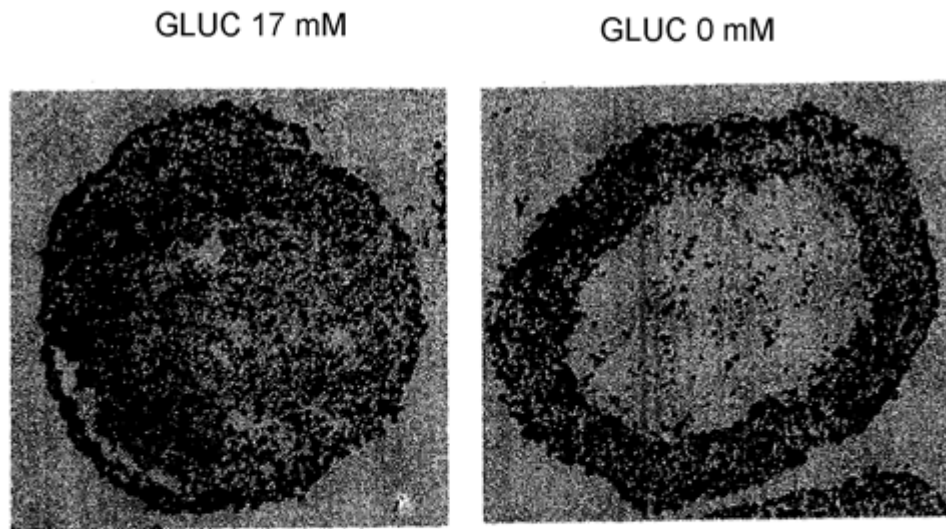


Fig. 8a

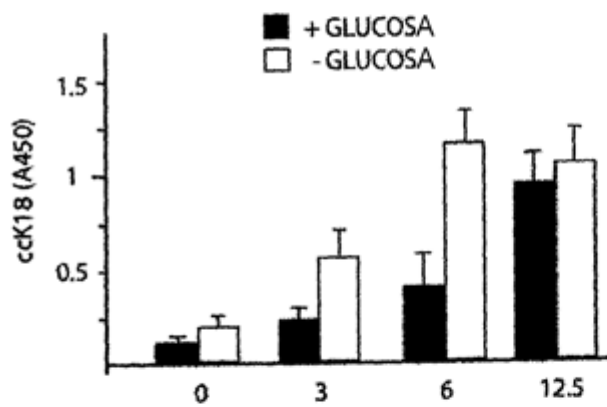


Fig. 8b

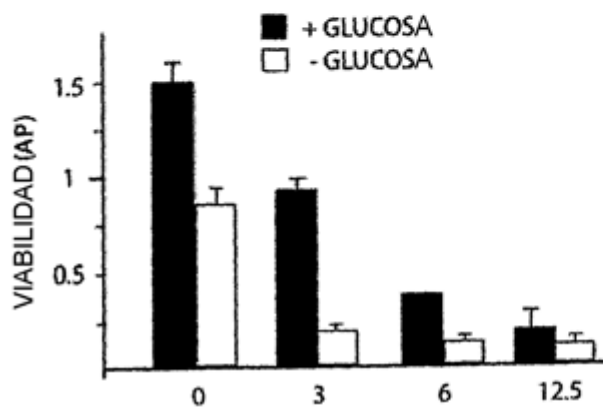


Fig. 8c