

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 735**

51 Int. Cl.:

**C07D 471/04** (2006.01) **A61K 31/4375** (2006.01)  
**C07D 487/04** (2006.01) **A61K 31/4706** (2006.01)  
**C07D 215/46** (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)  
**C07D 495/14** (2006.01)  
**C07D 239/88** (2006.01)  
**A61K 31/4162** (2006.01)  
**A61K 31/4985** (2006.01)  
**A61K 31/381** (2006.01)  
**A61K 31/4196** (2006.01)  
**A61K 31/498** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2008** **E 14197817 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018** **EP 2889297**

54 Título: **Activadores y aplicaciones terapéuticas de los mismos**

30 Prioridad:

**20.06.2007 WO PCT/FI2007/000175**

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

**12.02.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LAIHO, MARIKKI y**  
**PELTONEN, KARITA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 699 735 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

Activadores y aplicaciones terapéuticas de los mismos

**Campo de la invención**

5 En la presente memoria se describen métodos de identificación de moléculas pequeñas, que activan la ruta de p53 de supresión de tumor y/o de los miembros de la familia de la proteína p53. También se describen métodos de activación de la ruta de p53 de supresión de tumor, o de sus miembros de familia asociados, las proteínas p63 y p73 (en lo sucesivo denominados colectivamente como la ruta p53 o p53) por los compuestos de moléculas pequeñas, y métodos de tratamiento del cáncer y enfermedades que requieren la manipulación de la actividad de la ruta de p53 por las moléculas pequeñas. Esta activación de la ruta puede incluir rutas que actúan corriente arriba de p53, como la respuesta al daño del ADN, y enzimas que modifican a p53, y corriente abajo, es decir, a través de eventos activados por la familia de p53. Más específicamente, en la presente memoria se describen compuestos que pueden inducir la actividad de la ruta de p53, y que pueden ser utilizados terapéuticamente, ya sea solos o en combinación con otra terapia. El uso terapéutico incluye enfermedades tales como el cáncer, así como otras condiciones en las que la activación de la respuesta de la ruta de p53 es beneficiosa.

**Antecedentes de la invención**

15 El supresor de tumores p53 desempeña un papel central en un proceso por el cual una célula siente y responde a una variedad de tensiones. Actúa como un monitor crítico que previene la supervivencia de células con daños genéticos, y, posiblemente, otros tipos de daños permanentes que están más allá de la reparación. Estas respuestas evitan la acumulación de células dañadas y transformadas y protegen a los organismos de los procesos que podrían conducir a la formación maligna. Las propiedades clave de p53 indican claramente su importancia en las respuestas de estrés celular y daños celulares de las células. Los niveles de p53 son estrictamente regulados en células normales no estresadas por el producto de gen *MDM2*, que se une a p53 y pone a p53 como diana para la degradación mediada por ubiquitina por el proteasoma. Los agentes que dañan el ADN (por ejemplo, radiaciones ionizantes o no ionizantes y fármacos citotóxicos) y otros tipos de estrés (por ejemplo, la hipoxia y oncogenes) activan p53 lo que conduce a la activación del programa transcripcional de p53. Esto incluye la transactivación de un vasto número de los genes diana de p53 corriente abajo tales como p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (p21) y un número de objetivos de apoptosis asociados (por ejemplo, PUMA, NOXA, PIGS, etc.), muchos de los cuales aún no se han caracterizado (Zhao et al, 2000; Wang et al, 2001; Wei et al, 2006). p21 regula negativamente las quinasas implicadas en la progresión del ciclo celular por lo que se anula la transición del ciclo celular G<sub>1</sub>/S para dar tiempo a la reparación de daños en el ADN antes de la división celular. En presencia de daño irreparable, p53 puede inducir la apoptosis para eliminar las células dañadas. En ausencia de la función de p53, se acumulan las alteraciones del ADN, lo que lleva a la iniciación o progresión de la malignidad.

20 La familia de p53 incluye hasta ahora el miembro fundador, p53, y los miembros estrechamente relacionados más recientemente reconocidos, p63, y p73, así como, numerosas isoformas y versiones empalmadas alternativamente de cada isoforma (Murray-Zmijewski et al., 2006). p63 y p73 comparten muchas características estructurales y funcionales con p53, y activan un conjunto de genes que se superponen con p53. p63 es esencial en la morfogénesis epidérmica y desarrollo de las extremidades, mientras que su relevancia en el cáncer no está clara (Melino et al., 2003). Se sabe que p73 es esencial en el desarrollo neuronal, respuestas inflamatorias y comportamiento reproductivo (Murray-Zmijewski et al, 2006; Levrero et al., 2000). Tanto p63 como p73 son capaces de activar la detención del ciclo celular y un programa apoptótico similar al inducido por p53.

25 Un requisito previo para la activación transcripcional mediada por p53 es su capacidad para unirse específicamente a un elemento de respuesta (RE) dentro de los promotores de genes corriente abajo que comprende dos copias de la secuencia de consenso palindrómica "PuPuPuC(A/T)(T/A)GpyPyPy", separado por de 0-13 pb (el-Deiry et al., 1992). Este mismo elemento de respuesta también es utilizado por ambos p63 y p73 (Murray-Zmijewski et al., 2006; Levrero et al., 2000). Después de unirse al RE, p53 estimula el ensamblaje del complejo de preiniciación de la transcripción TFIID-TFIIA en el elemento TATA (Xing et al., 2001). La mayoría de las mutaciones de p53 encontradas en los tumores humanos se encuentran en el dominio central de p53 y afectan a residuos de aminoácidos que se ponen en contacto con el ADN de contacto o son necesarios para el correcto plegamiento de p53, aboliendo así la unión con RE y la activación transcripcional (Cho et al., 1994). Se ha demostrado que p53 se une a su RE exclusivamente como un tetrámero (Friedman et al., 1993). Sin embargo, la mayoría de los ER de p53 naturales no se encajan por completo en la secuencia de consenso (Kim et al., 1997), y otros factores, tales como modificaciones de p53, modificaciones de la cromatina y el plegado y unión de otros factores co-reguladores en sitios específicos del promotor, determinan la extensión de la respuesta transcripcional. Este mecanismo de acción se aplica a ambos p63 y p73 y ambos son capaces de utilizar el elemento RE para la unión específica a la secuencia, ellos también regulan un gran conjunto de dianas específicas para cada isoforma.

Más del 50% de los tumores humanos albergan mutaciones de TP53, que hacen que la proteína p53 esté alterada funcionalmente. Esto hace al gen TP53 ser el más comúnmente mutado en cánceres humanos. También se especula que los tumores humanos restantes tienen p53 disfuncional, por medio de la regulación alterada de la ruta de p53 o la proteína o por modificaciones de las interacciones proteína-proteína de p53. El papel esencial de p53 en

la supresión tumoral se evidencia también con las mutaciones de TP53 en línea germinal, que causan una predisposición al cáncer hereditario poco frecuente, el síndrome de Li-Fraumeni, y en modelos animales deficientes en p53 que tienen tumorigénesis seriamente aumentada.

Debido a sus propiedades inductoras de apoptosis, p53 es una diana muy atractiva para el desarrollo de fármacos. Un compuesto de fármaco en particular, nutlin-3a (Vassilev et al., 2004), es un activador muy específico de p53, y hemos establecido que nutlin-3a es el primer y altamente eficaz agente que induce linfoma de célula B (linfoma de derrame pleural con infección del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi) matando la célula tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de ratón (Sarek et al., 2007). Además, la activación de la ruta de p53 usando nutlin-3a no causa ningún efecto secundario adverso en el ratón. Sobre la base de estos estudios se ha concluido que la inactivación de la ruta de p53 por el virus VHSK se encuentra en la patogénesis de esta enfermedad maligna incurable.

Considerando que

i) p53 es una molécula altamente sensible al estrés celular y daño en el ADN, implicado en diversas enfermedades tales como el cáncer, isquemia, trastornos neuronales, inflamación y también en los procesos fisiológicos tales como el metabolismo celular normal, el desarrollo y el envejecimiento (Vousden y Lane, 2007),

ii) p53 es un activador clave de las rutas de la parada/apoptosis del ciclo celular y las rutas implicadas en los procesos mencionados anteriormente,

iii) sus mutaciones son poco frecuentes en varios cánceres humanos comunes resistentes a la quimioterapia (por ejemplo, melanoma, cáncer de próstata),

iv) su activación en los modelos condicionales de ratón tiene una potencia significativa para causar la regresión del tumor (Martins et al. 2006, Ventura et al. 2007, Xue et al., 2007), y

v) que los estudios piloto utilizando compuestos activadores de p53 tal como nutlin-3a (Vassilev et al., 2004, Sarek et al., 2007) muestran *in vivo* notables efectos antitumorales sin efectos secundarios, un desarrollo adicional de compuestos de pequeñas moléculas que afectan a la ruta de p53 está muy justificado y tiene potencial para la explotación terapéutica.

Wilson et al., "Synthesis of 5-deazaflavin derivatives and their activation of p53 in cells", *Bioorganic & Medicinal Chem.*, 15 (2007), páginas 77-86, describe la síntesis de una familia de derivados de 5-deazaflavina. Se evaluó su actividad biológica en células mediante la evaluación de su capacidad para estabilizar y activar p53. Vassilev L. T., "MDM2 inhibitors for cancer therapy", *Trends in Molecular Medicine*, Vol. 13, no. 1, páginas 23-31 describe el uso de inhibidores de molécula pequeña para inhibir murino doble minuto 2 (MDM2, del inglés double murine minute 2), que es un regulador negativo de p53, para el tratamiento del cancer. Nader Fotouhi y Bradford Graves, "Small Molecule Inhibitors of p53/MDM2 Interaction", *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 5 (2005), páginas 159-165 describe el uso de inhibidores de molécula pequeña para inhibir la interacción p53/MDM2. El documento WO 00/32175 A2 describe compuestos farmacéuticos orgánicos no-peptídicos para uso en el tratamiento del cancer en donde los compuestos son capaces de interactuar con formas mutantes y no mutantes de proteínas reguladoras relacionadas con el cancer, como la p53, de forma que la proteína mutante recupera la capacidad para interactuar correctamente con otras macromoléculas, de este modo restaurando o estableciendo toda o una parte de su actividad de tipo salvaje. El documento WO 2006/093518 A2 describe compuestos tienilos (particularmente compuestos (tien-2-il) amino) y usos de tales compuestos para tratar las afecciones relacionadas con virus en animales.

#### 40 Compendio de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso como se reivindica en la reivindicación 1 del compuesto 21, 7 o 15 (enunciado en la tabla 1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona el uso como se reivindica en la reivindicación 2 del compuesto 21, 7 o 15, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección selecciona de isquemia, un trastorno o inflamación neuronal.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona el compuesto 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, como se reivindica en la reivindicación 4.

#### 50 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Activación del reportero p53DsRed por los compuestos. Células PG3/9 de melanoma se incubaron con las concentraciones indicadas de los compuestos 1, 7, 9, 15, 20, 21, 22, 23 y nutlin-3a durante 24 horas, seguido por el análisis del porcentaje de células con reportero p53DsRed activado. El experimento se realizó por triplicado y se

puntuó usando una plataforma basada en células automatizada de  $\geq 1700$  eventos por punto de datos. Desviación estándar  $< 10,6$ .

5 Figura 2. Los compuestos de moléculas pequeñas disminuyen la viabilidad de células de melanoma en una manera dependiente de p53. Células A375 (A) y RPMI-7951 (B) se incubaron con las concentraciones indicadas de los compuestos 1, 7, 9, 21, 22, 23 y nutlin-3a por triplicado durante tres días, seguido de un ensayo de viabilidad celular usando el reactivo de proliferación celular WST-1.

10 Figura 3. Pruebas de viabilidad celular de los compuestos de moléculas pequeñas en células humanas normales. Las células se incubaron con las concentraciones indicadas de los compuestos 1, 7, 9, 21, 22 y nutlin-3a por triplicado durante tres días, seguido de un ensayo de viabilidad celular usando el reactivo de proliferación celular WST-1. (A) células de melanoma A375, (B) melanocitos primarios humanos normales, (C) fibroblastos diploides normales WS-1, (D) células endoteliales primarias humanas intestinales.

15 Figura 4. Los compuestos de moléculas pequeñas activan la ruta de p53. Células de melanoma A375 se trataron con los compuestos 1, 7, 9, 15, 20, 22 (5  $\mu\text{M}$ ) y con el compuesto 21 (0,5  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas seguido de análisis de inmunotransferencia de p53, Mdm2 y niveles de p21 (A) o tinción de inmunofluorescencia para p53 (B). GAPDH se utilizó como control de carga de proteína (A). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (B).

Figura 5. Los compuestos de moléculas pequeñas causan la parada del ciclo celular y la apoptosis. Células de melanoma A375 se trataron con los compuestos 1, 7, 9, y 22 durante tres días (a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ ) o durante seis días (a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ ) seguido de análisis de citometría de flujo. Las dosis de tratamiento para el compuesto 21 fueron de 0,1  $\mu\text{M}$  (tres días) y 0,5  $\mu\text{M}$  (seis días).

20 Figura 6. Los compuestos 7 y 15 induce estrés genotóxico. Células de melanoma A375 se trataron con los compuestos 1, 7, 9, 15, 20, 22 (5  $\mu\text{M}$ ) y con el compuesto 21 (0,5  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Las células se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo contra fosfo-H2AX. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342.

25 Figura 7. Pruebas de toxicidad in vivo. Se inyectó a ratones por ruta intraperitoneal los compuestos 7, 9, 15 y 22 (5, 10 y 20 mg/kg) y el compuesto 21 (0,5, 1, 2 mg/kg) tres veces a la semana durante tres semanas en 30 microlitros de DMSO, y los ratones de control recibieron vehículo DMSO. Los ratones fueron sacrificados y los órganos radiosensibles (timo, bazo, intestino) y el hígado y los riñones fueron recogidos para su posterior examen histológico. No se observaron toxicidades agudas o crónicas en los ratones en base a las tinciones HE histológicas (datos no mostrados). Las curvas de peso de los animales se representan gráficamente.

30 Figura 8. Actividad anti-tumoral in vivo de los compuestos. Se utilizó un modelo de xenoinjerto ortotópico de linfoma de derrame pleural combinado con imágenes del animal completo para evaluar las actividades antitumorales de los compuestos 15, 21 y 22. Ratones NOD-SCID hembras fueron inyectados por ruta intraperitoneal con células BC3-luc y se dejó que se establecieran los tumores. Como compuestos de tratamiento los ratones recibieron 2 mg/kg (compuesto 21) o 20 mg/kg (compuesto 15 y 22) siete veces a través de inyecciones intraperitoneales. Se obtuvieron imágenes de los ratones antes de cada inyección y se cuantificó y se representó gráficamente la bioluminiscencia como flujo total dentro de una región de interés (ROI) determinada.

### Descripción detallada de la invención

35 Para lograr la presente invención, se necesita considerar las preguntas clave acerca de los miembros de la familia de p53, tales como cómo se regulan y activan las proteínas. En base a este conocimiento, pueden desarrollarse nuevas estrategias para las intervenciones terapéuticas. El enfoque emprendido en la presente invención exploró 40 maneras de activar o potenciar más la activación de las rutas que afectan al tipo salvaje de p53 (o p63 y p73) con el fin de poner en marcha los programas de transcripción corriente abajo y otros eventos posteriores, incluyendo por ejemplo, la detención del ciclo celular, apoptosis, y respuestas oxidativas y metabólicas.

45 Un primer objeto descrito en la presente memoria fue desarrollar un ensayo para un cribado de alto rendimiento para pequeñas moléculas que regulan la ruta de la familia de p53. El ensayo es un ensayo basado en células que mide la activación de p53, p63 o p73.

Un segundo objeto descrito en la presente memoria fue identificar pequeños compuestos moleculares que activan la ruta de p53 y sensibilizan a las células mediante la activación de la respuesta de la ruta de p53. Para ello, se realizó un cribado de la librería química de alto rendimiento con el ensayo descrito en la presente memoria.

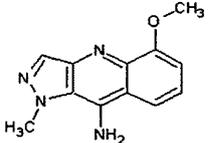
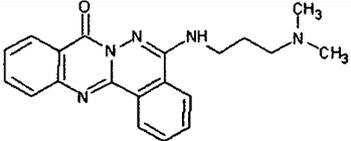
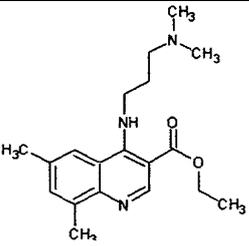
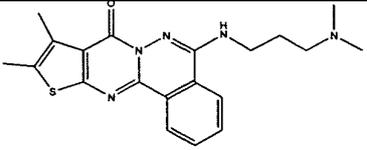
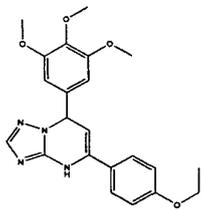
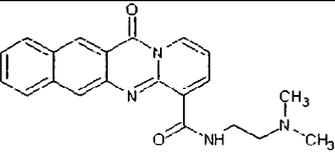
50 Un tercer objeto descrito en la presente memoria es un método de regulación, en particular, la activación de las rutas de p53 corriente arriba utilizando las moléculas pequeñas así identificadas.

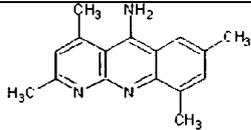
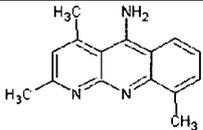
55 Un cuarto objeto descrito en la presente memoria es un método que afecta a las respuestas de las rutas de p53 mediante la exposición de las células a las pequeñas moléculas descrito en la presente memoria. Se incluye el método dirigido a inducir la muerte celular o detención de las células mediante la exposición de las células a la molécula pequeña. De particular interés es un método de control de las células con las moléculas pequeñas identificadas.

5 Un quinto objeto descrito en la presente memoria es un método para tratar enfermedades o afecciones responsables de la activación de la ruta de p53 mediante la administración a un paciente humano o no humano que lo necesite de una cantidad efectiva de la molécula pequeña descrita en la presente memoria. De particular interés es un método de tratamiento del cáncer y que tiene en cuenta el amplio espectro de actividades de p53 en otros estados fisiológicos y de enfermedad, como el estados isquémicos, trastornos neuronales, inflamación, metabolismo celular, desarrollo y envejecimiento, también de aquellos que requieren la activación controlada de la ruta de p53.

Unido al quinto objeto, un objeto adicional descrito en la presente memoria es una composición farmacéutica que contiene las moléculas pequeñas junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable de las mismas.

10 Los compuestos de moléculas pequeñas que figuran en la Tabla 1, a continuación son de particular interés para su uso en los métodos de regulación de la ruta de p53 y los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria.

Identificación del compuesto	Estructura	Nombre (IUPAC)	Fórmula
1		5-metoxi-1-metilH-pirazolo[4,3-b]quinolin-9-amina	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O
7		4-(3-dimetilaminopropilamino)-6,8-dimetil-quinolina-3-carboxilato de etilo	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O
9		4-(3-dimetilaminopropilamino)-6,8-dimetil-quinolina-3-carboxilato de etilo	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
15		4-(3-dimetilaminopropilamino)-6,8-dimetil-quinolina-3-carboxilato de etilo	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>
20		5-(4-etoxifenil)-7-(3,4,5-trimetoxifenil)-4,7-dihidro-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidina	
21		4-(3-dimetilaminopropilamino)-6,8-dimetil-quinolina-3-carboxilato de etilo	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>

Identificación del compuesto	Estructura	Nombre (IUPAC)	Fórmula
22		2,4,7,9-tetrametilbenzo[b]-1,8-naftiridin-5-amina	C16H17N3
23		2,4,9-trimetilbenzo[b]-1,8-naftiridin-5-amina	C15H15N3

Uso de compuestos 7, 21 o 15, para la fabricación de un medicamento como se reivindica en reivindicaciones 1 y 2. Los compuestos 1, 9, 20, 22 y 23 son compuestos de referencia.

- Además de los compuestos específicos nombrados anteriormente, también se describen en la presente memoria los homólogos cercanos e isómeros posicionales de los compuestos que tienen aplicabilidad terapéutica igual o más potente. Los homólogos cercanos son compuestos que difieren, por ejemplo, por la sustitución de un resto químico en el compuesto con un resto químico sucesivo, por ejemplo, la sustitución con un grupo metilo o un grupo etilo o viceversa. También se divulgan en la presente memoria sales farmacéuticamente aceptables, ésteres y profármacos de los compuestos.
- La cantidad de molécula pequeña utilizada para aplicaciones terapéuticas varía con las consideraciones estándar, tales como la naturaleza de la afección que se trata, y la edad y condición del paciente, y se determina en última instancia por el médico asistente. En general, sin embargo, las dosis empleadas para el tratamiento humano adulto típicamente están en el intervalo de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg por día, con una dosis preferida siendo aproximadamente de 1 µg/kg a aproximadamente 100 µg/kg por día. La dosis deseada se puede administrar convenientemente en una sola dosis, o como dosis múltiples administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como de dos, tres, cuatro o más subdosis por día. Las formulaciones se pueden administrar de una manera estándar, tal como por ruta oral, parenteral, sublingual, transdérmica, rectal, transmucosal, tópica, por inhalación, o por medio de administración bucal.
- Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración parenteral por inyección o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden estar en forma de suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de un polvo para reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de su uso.
- La composición farmacéutica también puede estar en la forma de comprimidos o pastillas formulados de manera convencional y con técnicas convencionales. Por ejemplo, los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón o polivinilpirrolidona), rellenos (por ejemplo, lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato de calcio o sorbitol), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol o sílice), disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato sódico), o humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Del mismo modo, las pequeñas moléculas pueden incorporarse en preparaciones líquidas tales como suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes, o elixires, utilizando técnicas y vehículos convencionales. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, como agentes de suspensión, tales como jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio, y grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, tales como lecitina, monooleato de sorbitán, o goma arábiga; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), tales como aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol y alcohol etílico; y conservantes, tales como p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico.
- Las composiciones farmacéuticas presentes también pueden estar en la forma de supositorios con bases de supositorio convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos o en una forma que deba administrarse por inhalación, típicamente en forma de una solución, suspensión o emulsión que se pueda administrar como un polvo seco o en forma de un aerosol usando un propulsor convencional. Las formulaciones transdérmicas típicas comprenden vehículos acuosos o no acuosos convencionales, y están en la forma de cremas, ungüentos, lociones, pastas, emplastos medicinales, parches o membranas.
- Las composiciones farmacéuticas pueden contener una o más de una de las pequeñas moléculas descritas en la presente memoria. Además, las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes activos adicionales, que son

activos en el tratamiento de la enfermedad diana. Por ejemplo, se pueden incluir agentes terapéuticos adicionales del cáncer o agentes activos para el tratamiento de efectos secundarios asociados con la terapia con fármacos en la composición farmacéutica o se pueden administrar simultáneamente, pero en una preparación separada, o secuencialmente a la composición farmacéutica que contiene las moléculas pequeñas.

## 5 Realizaciones experimentales de la invención

Ensayo de actividad de p53 in vitro

La capacidad de los compuestos para activar p53 se analizó usando un ensayo basado en células. Para establecer el ensayo, se generó un transfectante celular estable que expresaba un reportero sensible a p53. La línea celular del melanoma A375 (ATCC CRL-1619) se transfectó con un vector que contenía el elemento de consenso 13x de repetición de p53 (13XRE) (Kern et al., 1991) clonado a un vector reportero DsRed Express (Clontech) para producir el vector "PG13DsRed", en adelante denominado como "p53DsRed". Se seleccionaron clones de células estables en presencia de G418 (Calbiochem), y se analizaron clones resistentes a G418 para la activación del reportero p53DsRed por UVC y radiación gamma (fuente de <sup>157</sup>Cs), así como el uso de un compuesto de molécula pequeña inhibidor de la interacción p53-Mdm2, nutlin 3a (Alexis) (Vassilev et al., 2004). Se utilizó el clon de células PG3/9 en la pantalla.

El ensayo se llevó a cabo en un formato de 96 pocillos y todos los manejos de la placa se realizaron utilizando robots de manejo de líquidos (Thermo CRS, Thermo Electron Corporation; Biomek FX, Beckman Coulter y Hamilton de STAR, Hamilton Microlab). Las células se cultivaron en placas a 10.000 células /100 µl/ pocillo en ViewPlates de 96 pocillos (Packard) y se incubaron durante la noche a +37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las bibliotecas de compuestos químicos de molécula pequeña se adquirieron y se diluyeron con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 10 mM. Los compuestos fueron transferidos mediante alfiler a los medios completos a aproximadamente 3 µM de concentración, ya sea en forma simple (un compuesto/un pocillo) o como grupos de compuestos (dos compuestos/un pocillo). Se retiró el medio de crecimiento y se sustituyó por los medios con los compuestos de prueba seguido de incubación de las células durante 24 horas a +37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se incluyeron tratamiento con placebo (DMSO solo) y controles positivos (3 µM nutlin-3a) en cada placa de 96 pocillos. Después de la incubación, las células se lavaron con tampón fosfato salino y se fijaron con paraformaldehído (PFA, 4%, 25 minutos, temperatura ambiente) y los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33342 (Molecular Probes, 4 µg/ml, 2 minutos, temperatura ambiente).

Las señales de fluorescencia de Hoechst 33342 y la expresión del reportero DsRed en las células fijadas se analizaron mediante la plataforma de cribado ArrayScan 4,5 de alto contenido (Cellomics) que incluye un microscopio invertido (Zeiss 200M) con un objetivo de 10X (Zeiss), filtro de Omega XF93 (Omega), y cámara CCD ORCA-AG (Hamamatsu). El algoritmo utilizado para la adquisición y análisis de imágenes fue Target Activation Bioapplication (Cellomics), que fue montado para analizar el número total de células y el porcentaje de células positivas del reportero p53 denominadas como "respondedoras". Para cada pocillo, cuatro imágenes de ambos canales de fluorescencia fueron adquiridos correspondientes a aproximadamente 1.700 células en los pocillos tratados del placebo. Se calculó el número promedio de respondedoras para cada pocillo, y los compuestos que causaron la activación del reportero más de dos veces el promedio del número de respondedoras en las células tratadas del placebo en cada placa fueron considerados como éxitos.

En la pantalla secundaria los éxitos se recogieron y probaron en un rango de concentración de 100 nM a 10 µM. El tiempo de tratamiento del compuesto, las fijaciones y tinciones de células, así como la detección de la señal de fluorescencia fue como se describió anteriormente. Los compuestos que proporcionaron la activación consistente del reportero p53DsRed en la gama baja de concentración µM fueron seleccionados para su análisis posterior. La concentración eficaz 50 (EC50) se calculó usando la siguiente fórmula:

$$EC50 = \frac{(50\% \text{ inducción máxima} - \text{alto } \% \text{ inducción})}{(\text{bajo } \% \text{ inducción} - \text{alto } \% \text{ inducción})} \times (\text{baja concentración} - \text{alta concentración}) + \text{alta concentración}$$

## Ensayos de viabilidad

Se estudió el efecto de los compuestos seleccionados usando el ensayo de cribado de viabilidad de varias líneas de células tumorales, así como líneas de células diploides y cepas de células. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/ 100 µl/ pocillo y se incubaron durante la noche. Al día siguiente se aplicaron diluciones del compuesto que fueron desde 0 a 40 µM a las células por triplicado y se incubaron las células con los compuestos durante tres días. La viabilidad celular se ensayó usando el reactivo WST-1 de proliferación celular (Roche Diagnostics, Alemania). El reactivo WST-1 se diluyó 1:10 en medios de cultivo celular y se aplicó 100 µl de la dilución del reactivo sobre las células seguido de incubación de 1 hora a +37° C. La absorbancia específica se midió a 450 nm y se midió una absorbancia de referencia a 690 nm. El experimento se repitió de dos a tres veces y los resultados se presentan como % de viabilidad en comparación con el control. Los valores de CI50 representan la concentración inhibitoria del 50% y se calcularon utilizando la fórmula:

$$CI_{50} = \frac{(50 - \% \text{ bajo de inhibición})}{\% \text{ alto de inhibición} - \% \text{ bajo de inhibición}} \times (\text{concentración alta} - \text{concentración baja}) + \text{concentración baja}$$

#### Análisis de los niveles de proteína

5 Para estudiar el efecto de los compuestos sobre los niveles de proteína endógenos, células de melanoma A375 se trataron con los compuestos durante 24 horas. Los lisados celulares se prepararon en tampón de lisis que contenía 0,5% de NP-40 con inhibidores de proteinasa. Se separó la proteína (20-30 µg) por electroforesis de dodecil sulfato de sodio-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido por la transferencia a una membrana de PVDF (Immobilon™ -P, Millipore, Bedford, Mass., Estados Unidos). La inmunotransferencia se llevó a cabo utilizando anticuerpo DO-1 para p53, 2A10 para Mdm2 y anti-p21 (Becton Dickinson) para detectar p21, seguido por anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (p53) o biotina, seguido de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Mdm2 y p21) después de la cual se detectaron las proteínas con un aumento de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Life Sciences). La igualdad de la carga de proteínas se verificó utilizando GAPDH (p9.B.88, Europa Bioproducts Ltd, Reino Unido) como control de carga de proteína.

#### Citometría de flujo e inmunofluorescencia

15 Análisis del ciclo celular y apoptosis celular se ensayó con citometría de flujo (LSR, Beckton Dickinson). Las células fueron tratadas con los compuestos y tanto las células flotantes como las células adherentes se recogieron y se fijaron en etanol al 70% a -20° C, seguido por la tinción del ADN con yoduro de propidio. Se recogieron un total de 10.000 cuentas y los datos se analizaron usando el software ModFit LT 3.1. Las células presentes en la población sub-G 1 fueron consideradas como apoptóticas.

20 La tinción de inmunofluorescencia se llevó a cabo para determinar la localización correcta de p53 y para detectar la fosforilación de H2AX indicativa de estrés genotóxico. Las células fueron tratadas con los compuestos y se fijaron en paraformaldehído (PFA del 3,5%, 25 minutos a temperatura ambiente). Los cubreobjetos se permeabilizaron en 0,5% NP-40 y se bloquearon en 3% de albúmina de suero bovino (BSA). p53 se detectó por tinción con el anticuerpo FL-393 (Santa Cruz, 1:50, 1 hora a +37° C) seguido del anticuerpo secundario conjugado Alexa-594 (Molecular Probes, 1: 200, 1 hora a +37° C), se detectó fosfo-H2AX por tinción con anticuerpo anti-H2AX (P-Ser-139) (Upstate, 1: 200 1 hora a +37° C) seguido del anticuerpo secundario conjugado Alexa-488 (Molecular Probes, 1 : 200, 1 hora a +37° C). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342. Las imágenes fueron capturadas con el microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan equipado con la cámara Zeiss AxioCam HRc CCD y el software AxioVision 4.5 utilizando el objetivo 40X, NA = 0,75, filtros Chroma 31000, Chroma 41001 y 41004 para Hoechst, Alexa488 y Alexa594, respectivamente.

#### Pruebas de toxicidad in vivo

35 La toxicidad aguda y crónica de los compuestos se probó en ratones FVB/N. Los ratones hembra de 4-6 semanas de edad fueron adquiridos de Harlan y 2 animales fueron utilizados por dosis del compuesto. Los ratones fueron inyectados por ruta intraperitoneal con los compuestos tres veces a la semana durante tres semanas en 30 microlitros de DMSO. Dos animales recibieron sólo vehículo (= 30 µl, DMSO). Los animales se pesaron antes de las inyecciones y fueron vigilados a fin de detectar cualquier signo de toxicidad, angustia o comportamiento inusual. Los animales se sacrificaron tres días después de recibir la inyección final. El hígado, riñón, bazo, intestino delgado y timo se extirparon y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante la noche, y se procesaron en bloques de parafina. La tinción de hematoxilina-eosina (tinción HE) de los tejidos se realizó utilizando técnicas inmunohistológicas estándar.

#### Modelo de tumor in vivo

45 Se utilizó un modelo de xenoinjerto ortotópico de linfoma de derrame pleural para evaluar las actividades antitumorales de los compuestos 15, 21 y 22. Los ratones hembra NOD-SCID (Charles River, Francia) fueron inyectados por ruta intraperitoneal con células de linfoma de derrame pleural que llevan un reportero de luciferasa regulado de NF-kappaB estable (células-BC3 luc) (Keller et al., 2006). Los tumores se dejaron establecer durante tres días después de lo cual los ratones fueron fotografiados y divididos en grupos de tratamiento (4 a 5 ratones por grupo). Los tratamientos con el compuesto se iniciaron en el día cuatro. Los ratones recibieron 2 mg/kg (compuesto 21) o 20 mg/kg (compuestos 15 y 22) cada dos/tres días siete veces a través de inyecciones ip, los ratones de control recibieron sólo DMSO. Los ratones fueron fotografiados antes de cada inyección del compuesto. El 50 fotografiado se llevó a cabo con Xenogen In Vivo Imaging System (IVIS), D-luciferina (Synchem OHG, Alemania) se inyectó por ruta intraperitoneal (100 mg/kg) 10-15 minutos antes de cada imagen. La cuantificación se realizó utilizando Igor Pro Carbon software de análisis, la bioluminiscencia se cuantificó y se representó como flujo total dentro de un ROI dado.

#### Resultados

55 Después de un cribado de alto rendimiento inicial de 40.000 compuestos y el análisis de la activación de reportero en un ensayo basado en células mediante análisis de alto contenido de la imagen, se identificaron varios

compuestos de interés y se designaron como compuestos 1, 7, 9, 15, 20, 21, 22, y 23. Las estructuras de los compuestos 1, 7, 9, 15, 20, 21, 22, y 23 se muestran en la Tabla 1.

Estos compuestos se han validado como potentes (es decir, intervalo de bajo  $\mu\text{M}$ -nM) activadores de la actividad del reportero-p53. Como se muestra en la figura 1, cada compuesto (cmp) induce al reportero -p53 en células de melanoma con una capacidad que es igual o mayor que la de un compuesto control positivo, nutlin-3a. Las respectivas concentraciones eficaces (EC50) para cada compuesto son como sigue; cmp 1, 3,3  $\mu\text{M}$ ; cmp 7, 6,6  $\mu\text{M}$ ; cmp 9, 4,6  $\mu\text{M}$ ; cmp 15, 5,4  $\mu\text{M}$ ; cmp 20, 0,6  $\mu\text{M}$  cmp 21, 0,3  $\mu\text{M}$ ; cmp 22, 2,6  $\mu\text{M}$ ; cmp 23, 2,1  $\mu\text{M}$ . Con altas concentraciones de los compuestos 1, 22 y 23 se detectó una disminución en la fracción de células activadas por el reportero p53, al parecer debido a la muerte celular excesiva (no mostrado).

Se compararon los efectos de los compuestos utilizando pruebas de viabilidad celular en dos líneas celulares de melanoma, una que expresa p53 de tipo salvaje (A375) y una que tiene una mutación truncada de p53 y no produce un p53 funcional (RPMI-7951). Todos los compuestos probados fueron capaces de disminuir la viabilidad celular de la línea celular de melanoma wt p53, y fueron más o igual de potentes que nutlin-3a (Figura. 2A). Sin embargo, los compuestos fueron claramente mucho menos eficaces en la disminución de la viabilidad celular de la línea celular de melanoma con p53 mutante (Figura 2B).

También se ensayaron las toxicidades potenciales de los compuestos en varias líneas celulares humanas no transformadas que expresan p53 de tipo salvaje. Estos incluyen melanocitos, fibroblastos y células endoteliales intestinales humanas. Las células se incubaron con las concentraciones indicadas de los compuestos durante tres días, seguido por mediciones de viabilidad celular. Para cada compuesto, el IC50 fue menor para las células de melanoma A375 que para las líneas de células humanas normales (Figura 3, Tabla 2). Además, cada compuesto fue  $\geq 2,4$  veces más potente en la disminución de la viabilidad de las células de melanoma en comparación con la línea celular normal más sensible (células WS-1) (Tabla 2).

Table 2

		Compuesto					
Línea celular		1	7	9	21	22	Nutlin
<b>Melanoma A375 (WTP53)</b>	IC50	4,3	3,0	6,1	0,7	4,6	7,2
	SD	0,6	0,8	2,0	1,1	1,4	2,4
<b>RPMI7951 (MUT p53)</b>	IC50	14,7	16,8	17,8	3,0	13,3	>40
	SD	4,1	4,0	1,5	2,1	1,3	
<b>Fibroblasto diploide WS-1</b>	IC50	10,4	18,1	15,7	1,9	11,5	20,6
	SD	4,8	2,6	5,0	3,6	5,7	6,9
<b>Melanocito</b>	IC50	30,4	32,4	>40	>40	32,2	>40
	SD	1,8	1,1			0,7	
<b>Células endoteliales intestinales humanas</b>	IC50	13,1	19,6	19,6	2,7	14,5	10,7
	SD	0,8	2,8	1,6	5,1	2,0	10,7
diferencia de veces IC50 (A375)/ IC50(WS-1)		2,4	6,0	2,6	2,6	2,5	2,9

la activación de p53 se observa frecuentemente en conjunción con un aumento significativo de sus niveles de proteína. Por lo tanto, evaluamos los niveles de p53 y la posible inducción de sus genes diana, Mdm2 y p21. Las células de melanoma A375 se incubaron durante 24 horas con los compuestos indicados, los lisados de células se prepararon y analizaron por inmunotransferencia con anticuerpos de p53, Mdm2 y p21. Todos los compuestos ensayados aumentaron significativamente el nivel y la acumulación nuclear de p53 (Figuras 4A y B). Además, todos los compuestos indujeron la expresión de genes diana de p53 pero en un grado diferente. La inducción del inhibidor

de ciclina quinasa p21 fue más prominente con el compuesto 21, y la inducción de Mdm2 fue más prominente con los compuestos 1, 9, 21 y 22 (Figura 4A). Las diferencias en la capacidad de los compuestos para inducir Mdm2 y p21 son indicativos de que los compuestos pueden utilizar rutas mecanísticamente diferentes para la inducción de p53.

5 El efecto de los compuestos sobre las células de melanoma se evaluó mediante citometría de flujo. Las células de melanoma A375 se trataron con los compuestos, ya sea durante 3 o 6 días, seguido por tinción con yoduro de propidio y análisis de citometría de flujo. Se detectaron tres respuestas fenotípicas diferentes. Cpm 9 causó una detención en la fase G1 de las células, mientras que los compuestos 1, 21 y 22 causaron la detención en la fase G2 y la apoptosis. Por otra parte, el compuesto 7 causó una detención en la fase G2 inminente y aumentó la fracción apoptótica de las células (Figura 5).

10 La inducción del punto de control G2 se observa a menudo en respuesta al estrés genotóxico, tal como la radiación ionizante. Como tal, se puso a prueba si los compuestos inducen la fosforilación de la histona H2AX en serina-139 ( $\gamma$ H2AX), que es un marcador rápido y específico de la presencia de lesiones de hebras de ADN. Los cmps 7 y 15 indujeron una respuesta celular  $\gamma$ H2AX concordante con la inducción de la detención de la fase G2 (Figura 6).  
15 Juntos, los resultados son indicativos de que los cmps 7 y 15 inducen la ruta de p53 a través de una respuesta de estrés genotóxico. Es posible que los otros compuestos activen la ruta de p53 a través de otras rutas de activación de estrés celular por otros medios diferentes que el de causar roturas de la doble hebra de ADN.

Con el ensayo descrito en la presente memoria, se identificaron potentes compuestos de molécula pequeña que activan la ruta de p53. Los compuestos inducen la estabilización de p53, la unión específica de la secuencia, la activación del reportero, y tienen la capacidad de inducir los genes diana de p53. Todos los compuestos disminuyen selectivamente la viabilidad de las células tumorales a bajas concentraciones micromolares. Juntos, los resultados confirman que los compuestos indicados activan la ruta de p53 y causan la parada del ciclo celular y la muerte celular, características de los cuales que son beneficiosas en los intentos de restringir el crecimiento de células tumorales in vitro e in vivo. Estos efectos se pueden acoplar con la activación de la respuesta al daño del ADN celular. Las pruebas de toxicidad en el ratón utilizando inyecciones intraperitoneales de los compuestos 7, 9, 15, 21, y 22 (9 dosis/3 semanas) no mostraron ninguna toxicidad aparente en los animales como se indica mediante las curvas de peso (Figura 7), patologías macroscópicas, o tinción de hematoxilina-eosina de tejidos tales como el timo, bazo, intestino, hígado o riñón (no mostrados). Soporte para su utilidad potencial como agentes anti-tumorales se indica mediante un modelo de linfoma de células B ortotópico. Los ratones fueron inyectados con células de linfoma de derrame pleural BC-3 establemente integradas con un gen reportero de luciferasa (Keller et al., 2006). Una vez que se establecieron los tumores, según lo medido por el monitor de bioluminiscencia in vivo, los ratones se trataron con inyecciones intraperitoneales de los compuestos tres veces a la semana. El tratamiento de los animales con los compuestos 15 y 22 condujo a la inhibición visible del crecimiento de células tumorales mientras que el compuesto 21 no tuvo ningún efecto (Figura 8). Los resultados indican potenciales efectos anti-tumorigénicos de los compuestos.

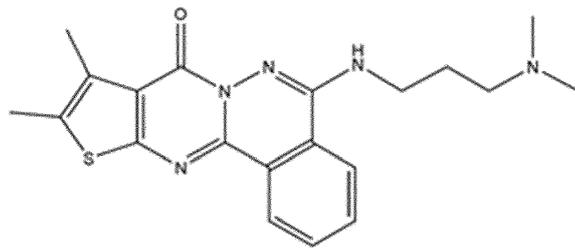
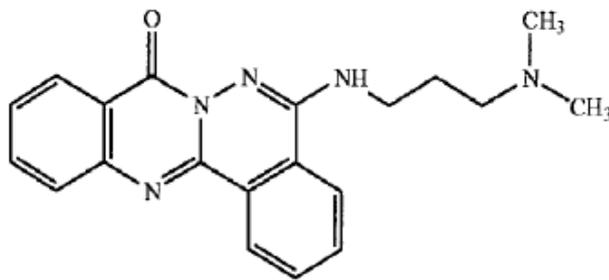
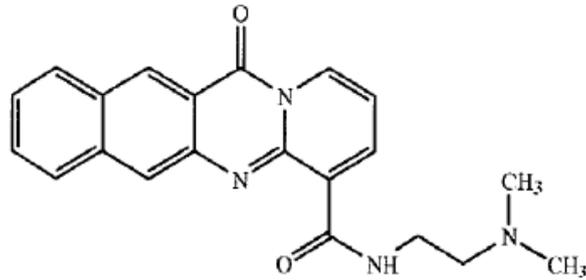
## Referencias

- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich N P. Crystal structure of a p53 tumor suppressor DNA complex, understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994 265: 346-55.
- 40 el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* 1992 1: 45-9.
- Friedman PN, Chen X, Bargonetti J, Prives C. The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 1,993 90: 3319-23.
- Haapajarvi T, Pitkanen K, Laiho M. Human melanoma cell line UV responses show independency of p53 function. *Cell Growth Differ* 1,999 10: 163 a 71.
- 45 Keller S A, Hernandez-Hopkins D, Vider J, Ponomarev V, Hyjek E, Schattner E J, Cesarman E. NF-kappaB is essential for the progression of KSHV- and EBV-infected lymphomas in vivo. *Blood.* 2006 107:3295-302.
- Kern S E, Kinzler K W, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science.* 1991 252:1708-11.
- 50 Kim E, Albrechtsen N, Deppert W. DNA-conformation is an important determinant of sequence-specific DNA binding by tumor suppressor p53. *Oncogene.* 1997 15:857-69.
- Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang J Y, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci.* 2000 113:1661-70.
- Martins C P, Brown-Swigart L, Evan G1. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* 2006 127:1323-34.

- Melino G, Lu X, Gasco M, Crook T, Knight R A. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci.* 2003 28:663-70.
- Murray-Zmijewski F, Lane D P, Bourdon J C. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* 2006 13:962-72.
- 5 Sarek G, Kurki S, Enback J, Iotzova G, Haas J, Laakkonen P, Laiho M, Ojala P M. Reactivation of the p53 pathway as a treatment modality for KSHV-induced lymphomas. *J Clin Invest.* 2007 117:1019-28.
- Vassilev L T, Vu B T, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu E A. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science.* 2004 303:844-8.
- 10 Ventura A, Kirsch D G, McLaughlin M E, Tuveson D A, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek E E, Weissleder R, Jacks T. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 2007 445:661-5.
- Vousden K H, Lane D P. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 8:275-83.
- Wang L, Wu Q, Qiu P, Mirza A, McGuirk M, Kirschmeier P, Greene J R, Wang Y, Pickett C B, Liu S. Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches. *J Biol. Chem.* 2001 276:43604-10.
- 15 Wei C L, Wu Q, Vega V B, Chiu K P, Ng P, Zhang T, Shahab A, Yong H C, Fu Y, Weng Z, Liu J, Zhao X D, Chew J L, Lee Y L, Kuznetsov V A, Sung W K, Miller L D, Lim B, Liu E T, Yu Q, Ng H H, Ruan Y. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell.* 2006 124:207-19.
- Xing J, Sheppard H M, Corneillie S I, Liu X. p53 Stimulates TFIIID-TFIIA-promoter complex assembly, and p53-T antigen complex inhibits TATA binding protein-TATA interaction. *Mol Cell Biol.* 2001 21:3652-61.
- 20 Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman W H, Tom E, Mack D H, Levine A J. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev.* 2000 14:981-93.
- Xue W, Zender L, Miething C, Dickins R A, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe S W. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 2007 445:656-60.

REIVINDICACIONES

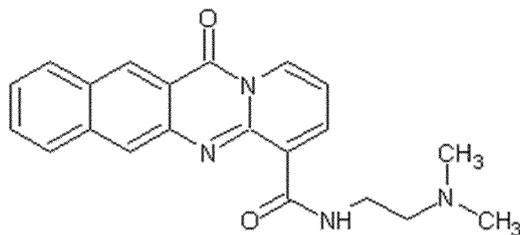
1. Uso de un compuesto que tiene la fórmula seleccionada del grupo que comprende



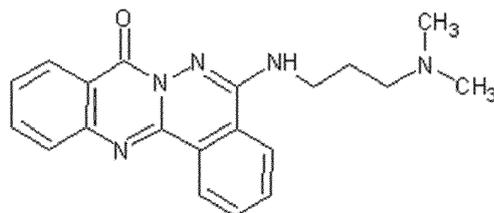
5

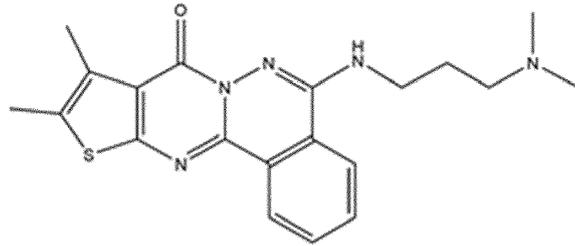
o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

2. Uso de un compuesto que tiene la fórmula seleccionada del grupo que comprende



10

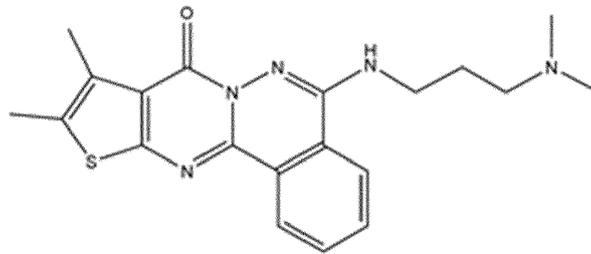




5 o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección seleccionada de isquemia, un trastorno o inflamación neuronal.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el compuesto se usa en la activación de una respuesta de la ruta de p53.

4. Un compuesto que tiene la fórmula

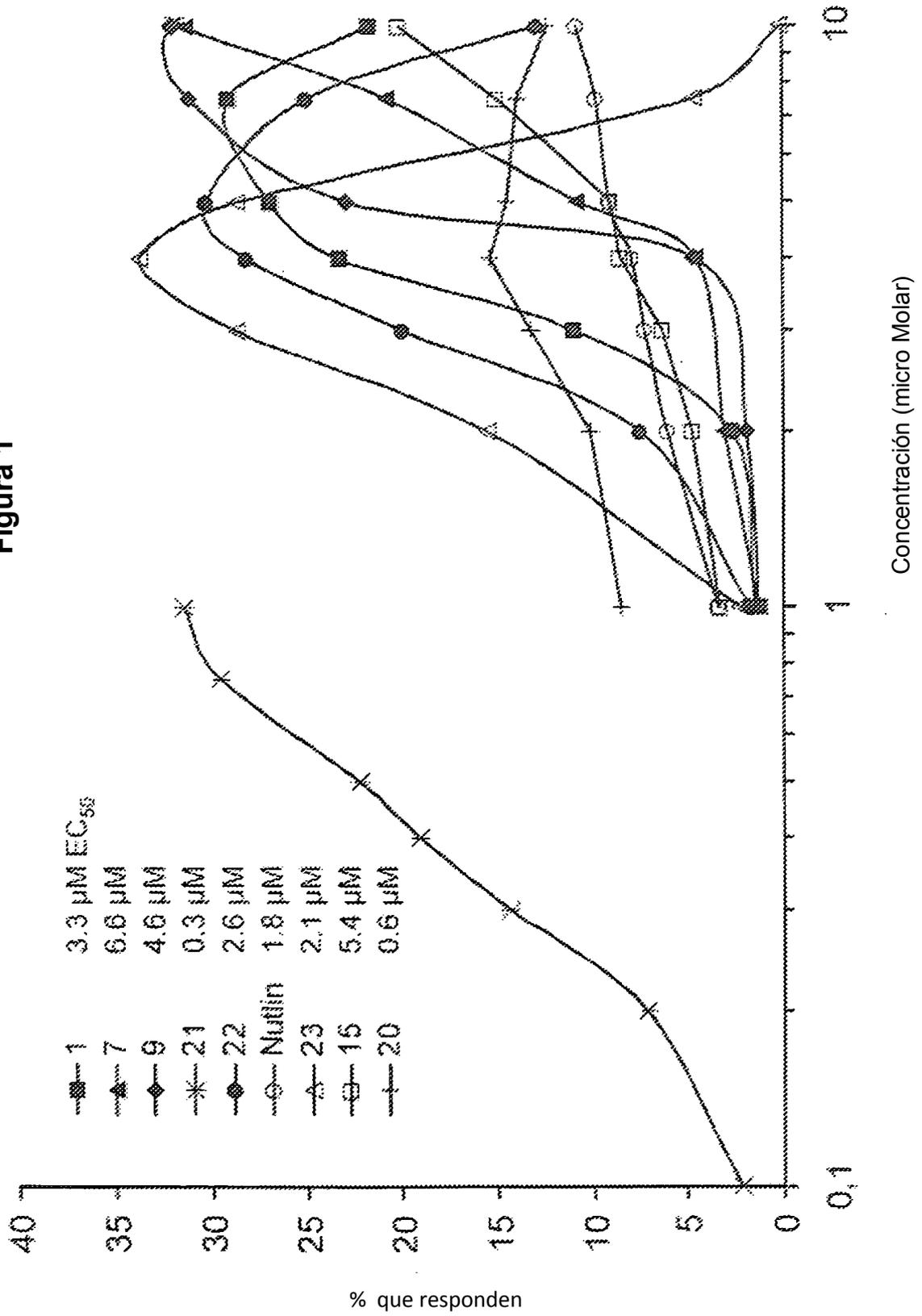


10 o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento del cáncer.

5. El compuesto para uso según la reivindicación 4, en donde la administración del compuesto se lleva a cabo a una dosis en el intervalo 0,001 mg/kg a 200 mg/kg por día.

15 6. El compuesto para uso según la reivindicación 4 o 5, en donde la administración del compuesto se efectúa oralmente, parenteralmente, sublingualmente, transdérmicamente, por vía rectal, transmucosal, tópicamente, por inhalación, o por medio de administración bucal.

Figura 1



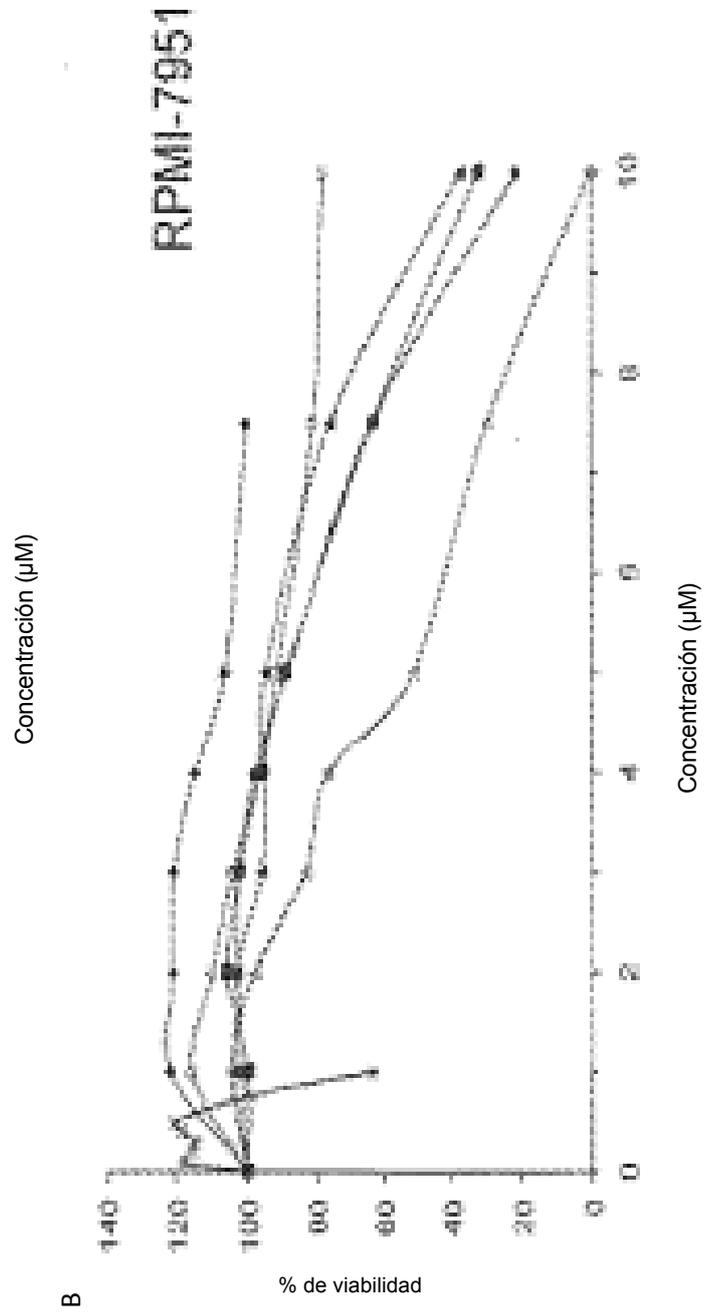
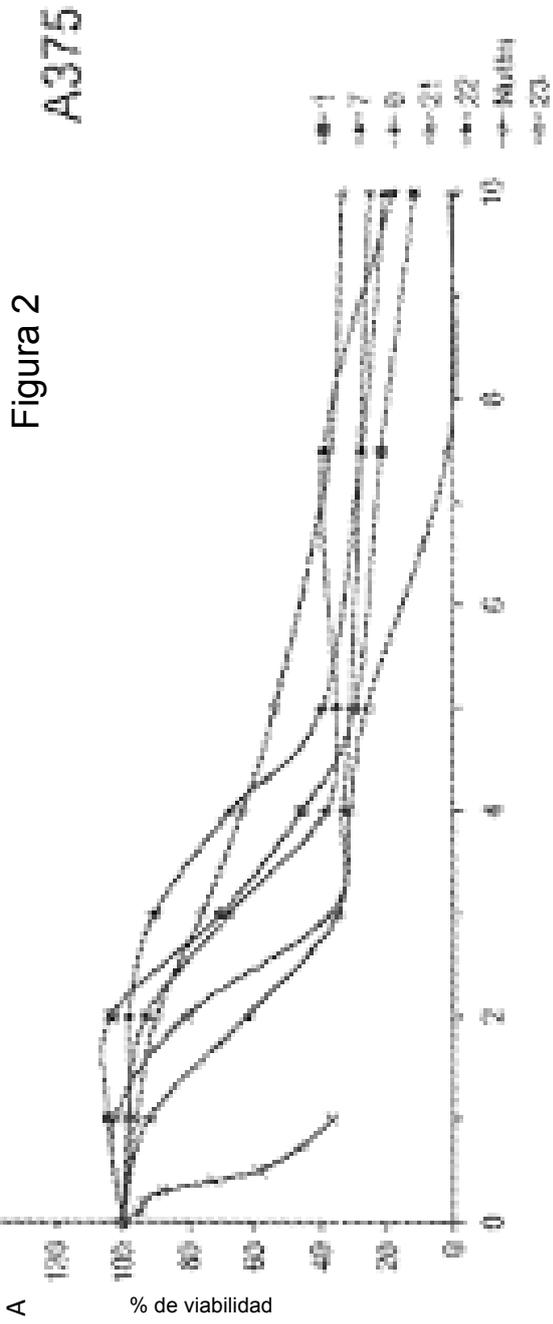
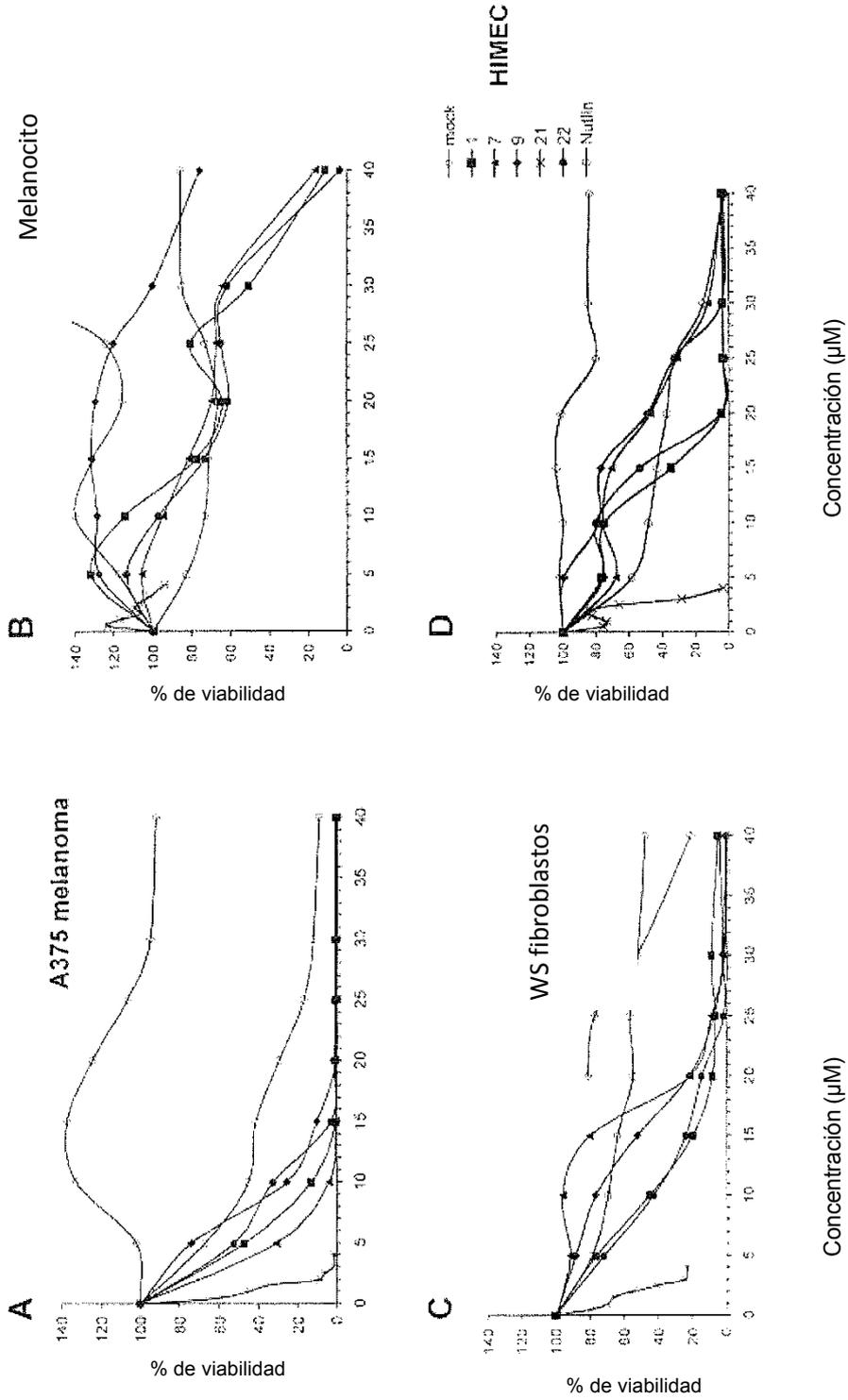


Figura 3



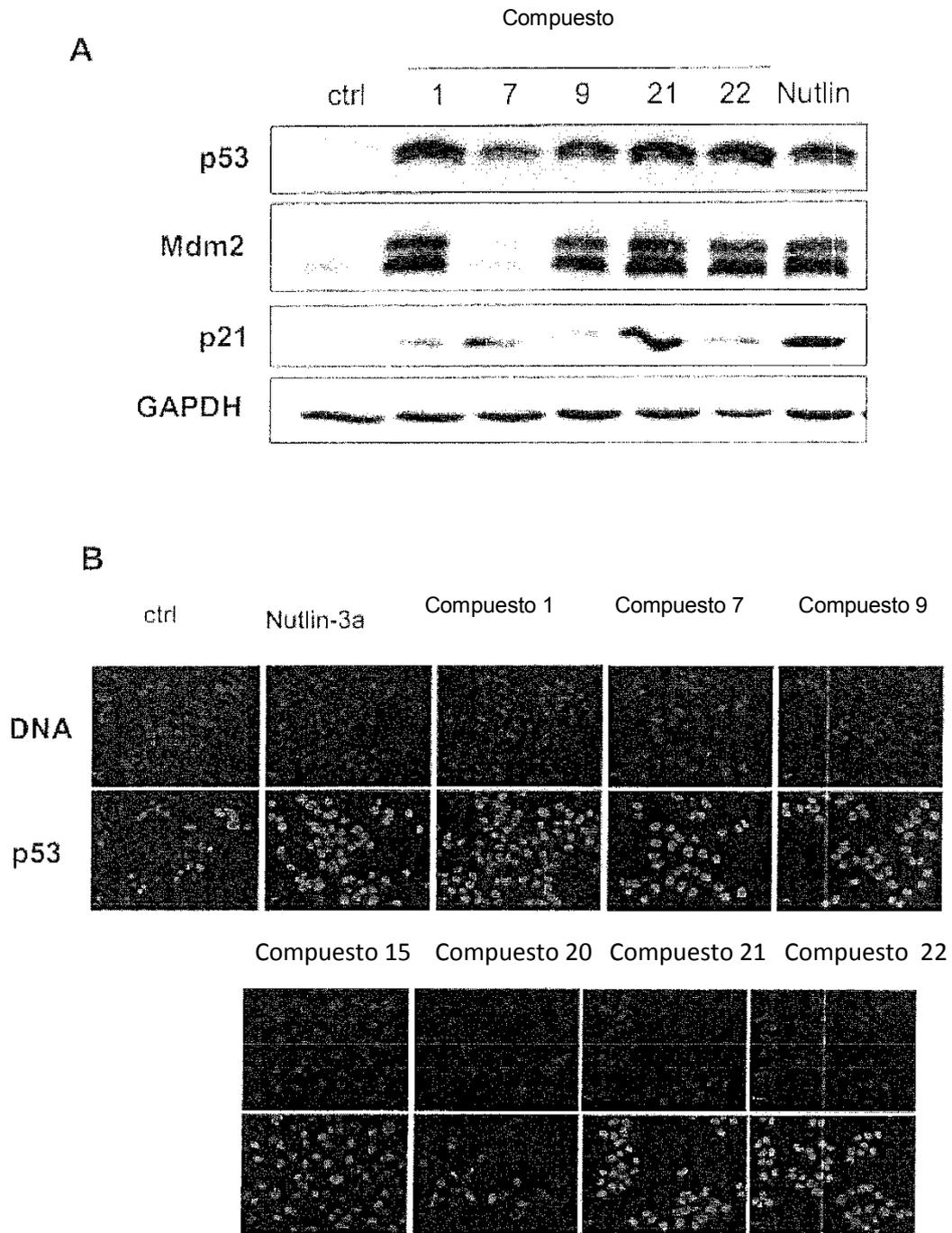
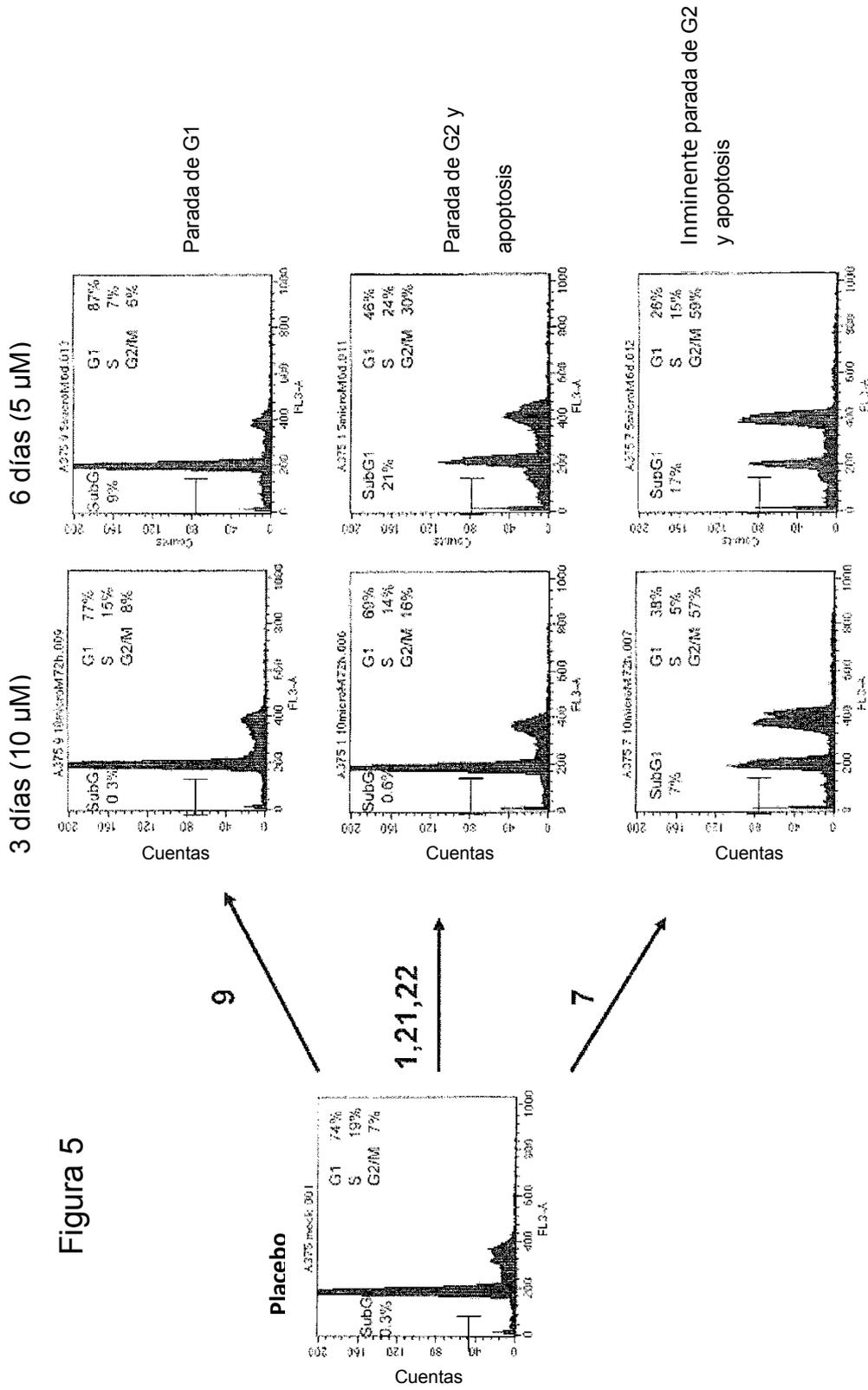


Figura 4

Tratamiento



Parada de G1

Parada de G2 y apoptosis

Inminente parada de G2 y apoptosis

Figura 6

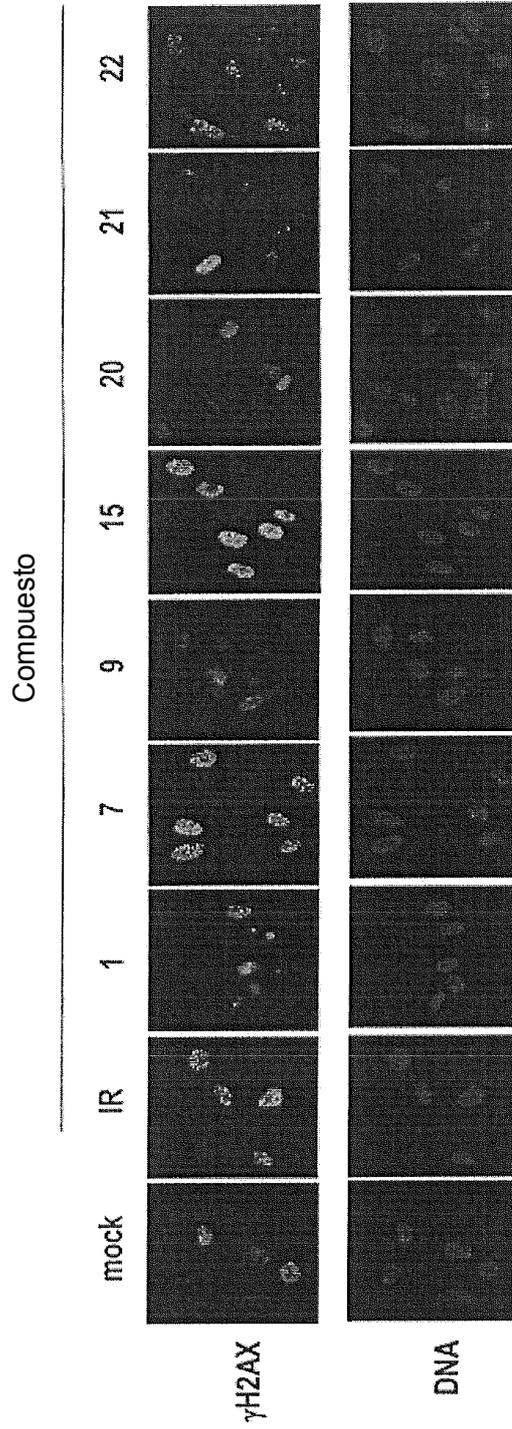
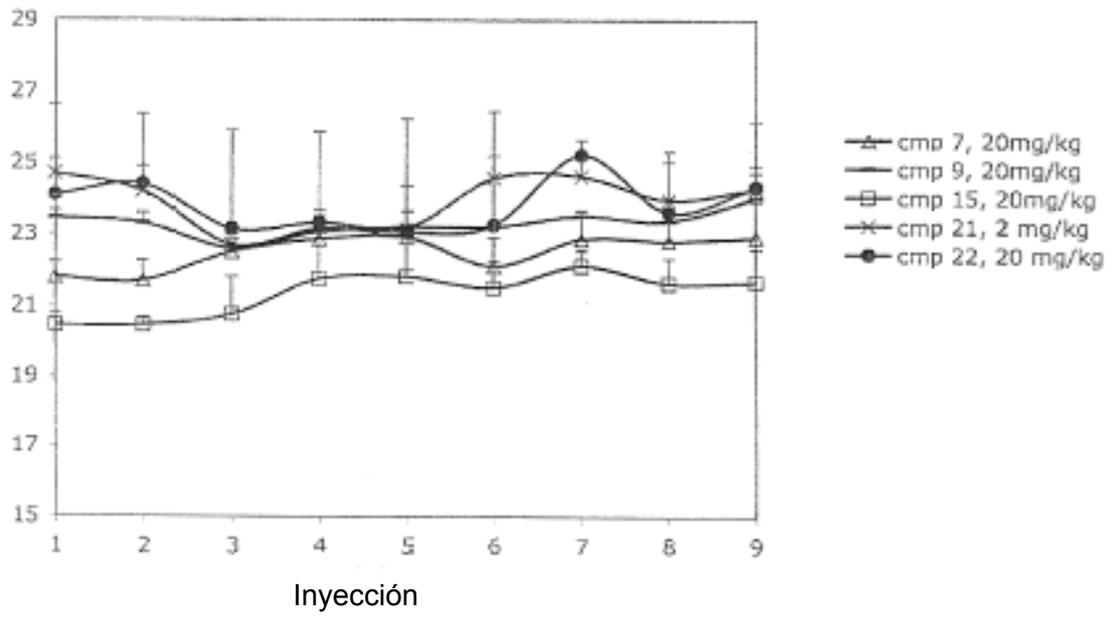


Figura 7



**Figura 8**

