(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 727 273**

(51) Int. CI.:

A61K 31/167 (2006.01)
A61K 31/18 (2006.01)
A61K 31/382 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2011 PCT/US2011/027606**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO11112623**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2011 E 11709273 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2544673**

(54) Título: **Terapias inhibidoras de la autofagia basadas en tioxantina para tratar el cáncer**

(30) Prioridad:

08.03.2010 US 311736 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2019

(73) Titular/es:

SPECTRUM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
157 Technology Drive
Irvine, CA 92618, US

(72) Inventor/es:

NAWROCKI, STEFFAN, T.;
CAREW, JENNIFER, S, y
REDDY, GURU

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Terapias inhibidoras de la autofagia basadas en tioxantina para tratar el cáncer

Introducción

El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos, con 1.228.600 casos nuevos, y 564.800 muertes estimadas para 1998. Durante los últimos 50 años, la tasa de fallecimientos por el cáncer ha aumentado a un ritmo constante, debida principalmente a un importante aumento en las tasas de cáncer de pulmón resultado del tabaquismo. Los cánceres se producen en personas de todas las edades, pero su aparición aumenta significativamente en personas de más de 45 años de edad. Sin embargo, el cáncer es la principal causa de muerte en Estados Unidos para las personas con edades comprendidas entre 35 y 65, y es también la principal causa de muertes no producidas por accidente entre los niños estadounidenses menores de 15 años. Los hombres tienen una tasa de mortalidad por el cáncer superior a las mujeres, y las personas negras tienen la mayor tasa de mortalidad por cáncer de entre los principales grupos raciales. En Estados Unidos, los hombres tienen aproximadamente de 1 a 2 en riesgo de tiempo de vida de desarrollar cáncer y las mujeres tienen aproximadamente de 1 a 3 en riesgo de tiempo de vida. Con la continua disminución anticipada de fallecimientos derivados de cardiopatías e ictus, el cáncer se convertirá en la causa principal de fallecimiento para la totalidad de la población estadounidense para el año 2010.

El diagnóstico del cáncer suele requerir un examen histológico de una muestra de biopsia de un tejido realizada por un patólogo, aunque la indicación inicial de neoplasias pueden ser los síntomas o anomalías de imágenes radiográficas. Una vez diagnosticado, el cáncer se trata normalmente mediante cirugía, quimioterapia, radioterapia, o terapias dirigidas como la inmunoterapia, terapia hormonal, o terapia con inhibidores de la angiogénesis. La selección de la terapia depende de la localización y el grado del tumor y el estadio de la enfermedad, así como del estado general del paciente (estado de comportamiento). Además, dependiendo del tipo y etapa del cáncer, dos o más de estos tipos de tratamientos del cáncer se pueden combinar al mismo tiempo o utilizarse uno después del otro. Aunque la completa eliminación del cáncer sin dañar el resto del cuerpo sea el fin del tratamiento, los enfoques actuales para tratar el cáncer han tenido un éxito limitado. Con respecto a la cirugía, esto se debe, en parte, a la propensión de células cancerosas individuales o en pequeño número a invadir el tejido adyacente o a metastatizar a sitios distantes, limitando de esta forma la eficacia de los tratamientos quirúrgicos locales. La eficacia de la quimioterapia y radioterapia frecuentemente se ve limitada por la toxicidad o el daño a los tejidos normales del cuerpo. Por lo tanto, serían muy deseables compuestos, composiciones y métodos que puedan proporcionar un tratamiento más eficaz del cáncer. Además, también serían muy deseables compuestos, composiciones y compuestos que pudieran tratar un tipo concreto del cáncer para el que no exista actualmente una terapia.

La autofagia (macroautofagia o autofagocitosis), es un proceso catalítico por el cual las células degradan componentes citoplasmáticos dañados, redundantes o bien innecesarios entre los que se incluyen proteínas y orgánulos mediante la maquinaria lisosómica. Al ser un proceso muy bien regulado, esta ruta de degradación se induce mediante la privación de nutrientes, estrés metabólico o condiciones microambientales para garantizar el equilibrio energético, eliminación de proteínas dañadas y adaptación al estrés. La autofagia desempeña un papel en el crecimiento y desarrollo de las células normales, ayudando a mantener un equilibrio entre la síntesis y la degradación de los componentes celulares. De manera adicional, este proceso proporciona productos de descomposición que sirven como una fuente alternativa de energía durante periodos de estrés metabólico para mantener la homeostasia y la viabilidad. Por tanto, la autofagia desempeña una función citoprotectora en situaciones de privación de nutrientes.

El proceso de autocanibalización implica la encapsulación de una parte del citoplasma celular en una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma o vesícula autofágica, secuestrando componentes entre los que se incluyen proteínas y orgánulos del resto del citoplasma. Los autofagosomas se forman a partir de la elongación de pequeñas estructuras de la membrana conocidas como precursores del autofagosoma. Esta formación se inicia por la fosfoinosita 3-quinasa de clase III y el gen relacionado con la autofagia (Atg) 6 (también conocido como Beclin-1). El alargamiento de estos precursores del autofagosoma requiere la participación de 2 sistemas de conjugación de tipo ubiquitina que producen complejos modificados de reguladores de la autofagia. Uno implica la conjugación del complejo ATG12-ATG5-ATG16 y el otro el complejo de fosfatidiletanolamina (PE) a LC3/ATG8 y a la proteasa ATG4. A continuación se producen la nucleación, expansión y desrrevestimiento para completar la formación del autofagosoma. La membrana exterior del autofagosoma se fusiona después en el citoplasma con un lisosoma para formar un autolisosoma o autofagolisosoma donde su contenido se degradada a través de las hidrolasas lisosómicas ácidas. El resultado final de la activación autofágica es muy dependiente del contexto celular y la resistencia y la duración de la señal inductora de estrés.

Los productos de descomposición del citoplasma y orgánulos incluidos aminoácidos, ácidos nucleicos lipídicos y azúcares, se exportan desde los lisosomas por permeasas al citoplasma. Las células utilizan estos productos de descomposición como bloques de construcción para la síntesis macromolecular o para mantener la homeostasia de la energía. Por tanto, la autofagia es un mecanismo principal por el cual una célula recicla y redistribuye nutrientes a procesos celulares más esenciales. La autofagia también funciona en el control de calidad de proteínas y orgánulos degradando componentes celulares antiguos o dañados tales como mitocondrias despolarizadas y proteínas desplegadas. La renovación de proteínas y orgánulos mediante autofagia es un proceso fundamental para evitar la

acumulación tóxica de componentes celulares antiguos y dañados para mantener la homeostasia.

La autofagia está surgiendo como un novedoso mecanismo crioprotector para aumentar la supervivencia de las células en condiciones de estrés metabólico e hipoxia, así como para escapar de la muerte celular inducida por quimioterapia, radioterapia o una terapia dirigida. Por ejemplo, los cánceres agresivos se basan en la autofagia para soportar el metabolismo y mantener la supervivencia de la célula tumoral, especialmente en entornos de hipoxia y agotamiento de nutrientes. Además, la autofagia produce un pequeño número de células tumorales latente con capacidad de reanudar la proliferación celular cuando el estrés desaparece. Por tanto, la autofagia proporciona a las células cancerosas la flexibilidad para tolerar estrés, incluso el estrés terapéutico, y de reanudar el crecimiento cuando las condiciones sean más favorables. Este proceso de supervivencia al estrés, latencia, y regeneración proporcionada por la autofagia puede ser un obstáculo principal para conseguir un tratamiento contra el cáncer satisfactorio. Además, un aspecto principal del tratamiento contra el cáncer tal como, por ejemplo, quimioterapia, terapia dirigida, y radioterapia, es infringir daño a las células tumorales suficiente para destruirlas mediante apoptosis, necrosis o formas alternativas de muerte celular. Además del estrés metabólico inherente en el microambiente tumoral, estos tratamientos amplifican el estrés celular e inician la autofagia. Por tanto, la autofagia permite una supervivencia prolongada de las células tumorales proporcionando una función protectora para limitar la necrosis e inflamación tumoral, y para mitigar el daño genómico en células tumorales en respuesta al estrés metabólico y apoptosis inducida por la terapia.

Como la autofagia es una ruta de supervivencia que utilizan las células tumorales para tolerar estrés metabólico, se espera que los inhibidores de la autofagia sean útiles para terapia contra el cáncer. Los inhibidores de la autofagia son especialmente atractivos debido a que pueden dirigirse a las células tumorales situadas en regiones tumorales hipóxicas, que son resistentes al tratamiento, especialmente por radiación. De manera adicional, las células tumorales en proceso de metástasis pueden ser especialmente dependientes de la autofagia, respaldando enfoques para eliminar la autofagia en la progresión temprana y el escenario con adyuvantes. Una terapia para el cáncer especialmente útil sería el uso de agentes que inhibieran la degradación autofágica para mejorar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos convencionales, que por lo general activan la ruta autofágica. Se espera que la adición de inhibidores de la autofagia mejore la citotoxicidad de estos agentes. Por ejemplo, el tratamiento con un inhibidor de la autofagia debería aumentar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos inductores de apoptosis en pacientes con cáncer humanos. Por lo tanto, una terapia para el cáncer dirigida a bloquear la supervivencia mediada por la autofagia usando inhibidores de la autofagia puede ser extremadamente valiosa.

Aunque la identificación de los inhibidores clave de la autofagia es muy deseable, se carece en la actualidad de agentes que se dirijan específicamente a la ruta autofágica. La presente memoria descriptiva proporciona inhibidores de la autofagia que, combinados con un compuesto quimioterapéutico, dan como resultado un efecto sinérgico beneficioso para el tratamiento de una amplia gama de cánceres.

Luo *et al., Anticancer Research,* 2004, 24, 2127-2134 describen que la lucantona inhibe la actividad de reparación de la AP endonucleasa, APE1, pero no su función rédox o la actividad exonucleasa en nucleótidos con emparejamientos incorrectos. Se describe además que la lucantona parece inhibir los miembros de la familia de la exonucleasa III (APE1 y Exolll), pero no endonucleasas AP como la endonucleasa IC, ni las glicolasas/liasa bifuncionales tales como la endonucleasa VIII o la formamidopirimidina-ADN glicolasa (Fpg). Además, la adición de lucantona inhibe la actividad de reparación de APE1 en extractos celulares y potencia el efecto de destrucción celular del agente alquilante de laboratorio metanosulfonato de metilo (MMS) y del agente clínicamente relevante temozolomida (TMZ).

El documento US 2009/221615 describe método de tratamiento del cáncer en mamíferos mediante la administración de lucantona y al menos un antimetabolito. Se divulgan composiciones farmacéuticas y kits que comprenden lucantona y al menos un antimetabolito.

El documento WO 00/50031 describe un método para tratar tumores primarios del sistema nervioso central en un hospedador que comprende administrar radiación al hospedador y administrar lucantona al hospedador; en el que la radiación y la lucantona se administran en cantidades eficaces para producir la detención o la regresión del tumor primario del sistema nervioso central en el hospedador. También se divulga un método para tratar tumores primarios del sistema nervioso central que incluye inducir daños en bases del ADN de células tumorales; e inhibir la reparación por escisión de dicho dañó proporcionando lucantona a la célula.

El documento US 2004/018968 describe un método para el tratamiento del cáncer en un paciente que lo necesita. El método comprende administrar a un paciente que lo necesita una primera cantidad de un inhibidor de una histona desacetilasa en un primer procedimiento de tratamiento, y una segunda cantidad o la dosis de radiación en un segundo procedimiento de tratamiento. El primer y segundo tratamientos, conjuntamente, comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz. La combinación del inhibidor de HDAC y la radioterapia se describe como terapéuticamente sinérgica.

Ma *et al., Drugs,* 2009, 69, 1911-1934 resume el actual estado de los inhibidores de la histona desacetilasas (HDAC), como monoterapia o junto con otros agentes en diferentes fases de ensayos clínicos. En la mayoría de los ensayos clínicos, los inhibidores de HDAC fueron tolerables y ejercieron actividad biológica o antitumoral. Los inhibidores de HDAC se han estudiado en ensayos clínicos de fase I, II y III con eficacia variable. La combinación de inhibidores de

HDAC con otros agentes antineoplásicos incluidos agentes epigenéticos o quimioterapéuticos demostró un resultado clínico favorable.

Savickiene *et al., European Journal of Pharmacology,* 2006, 549, 9-18 describe los efectos *in vitro* del BML-210 en líneas celulares de leucemia humana (NB4, HL-60, THP-1 y K562). Se ha notificado que BML-210 inhibe el crecimiento de todas las líneas celulares y fomenta la apoptosis de una forma dependiente de la dosis y del tiempo.

Remiszewski *et al., Journal of Medicinal Chemistry,* 2002, 45, 753-757 describe que se han preparado análogos de ácido suberoilanilida hidroxámico (SAHA) y tricostatina A y se han evaluado en un ensayo de inhibición de enzimas humanas con HDAC, un ensayo con el promotor p21(waf1) (p21) y ensayos de inhibición de crecimiento en monocapa. Un compuesto, 4-(dimetilamino)-N-[7-(hidroxiamino)-7-oxoheptil-benzamida, se ha descubierto que afecta el crecimiento de un panel de ocho células tumorales de forma diferencial.

Faivre *et al., Nature Reviews Drug Discovery,* 2007, 6, 734-745 resume el descubrimiento y el desarrollo de sunitinib, y analiza aspectos clave del enfoque multiobjetivo en el tratamiento contra el cáncer, tales como marcadores de respuesta y el desarrollo de resistencia y su significado para el futuro desarrollo de sunitinib y otros inhibidores multiquinasas.

Sumario

La presente invención proporciona un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona para su uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 1 y un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia para su uso en el tratamiento del cáncer de un mamífero de acuerdo con la reivindicación 11. La invención también proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 y un kit farmacéutico de acuerdo con la reivindicación 13. Se describen en el presente documento inhibidores de la autofagia basados en tioxantona. Los inhibidores de la autofagia basados en tioxantona útiles incluyen 1-((2-(dietilamino)etil)amino)-4-metiltioxanten-9-ona, 1-(2-dietilaminoetilamino)-4-(hidroximetil)-9-tioxantenona, N-[[1-[[2-(dietilamino)etil]amino]-9-oxo-9H-tiaxanten-4-il]metil]metanosulfonamida, análogos de indazol de los mismos, o sales de los mismos.

Otros aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia. Los ejemplos de dichos compuestos incluyen trióxido de arsénico, etopósido, rapamicina, inhibidores de la histona deacetilasa, inhibidores de la tirosina quinasa, tamoxifeno, temozolomida, imatinib, el inhibidor de la histona desacetilasa bortezomib. Los inhibidores de la histona desacetilasa útiles incluyen un inhibidor de la histona desacetilasa de tipo hidroxamato o un inhibidor de la histona desacetilasa de tipo benzamida. Los ejemplos no limitativos de dichos inhibidores incluyen (2E,4E,6R)-7-(4-dimetilaminofenil)-N-hidroxi-4,6-dimetil-7-oxohepta-2,4-dienamida, N-hidroxi-N'-feniloctanediamida, 4-Dimetilamino-N-(6-hidroxicarbamoilhexil)-benzamida, N-hidroxi-3-[(E)-3-(hidroxiamino)-3-oxoprop-1-enil]benzamida, (2E)-3-[3-(anilinosulfonyl)fenil]-N-hidroxiacrilamida, ((E)-N-hidroxi-3-[4-[[2-hidroxietil-[2-(1H-indol-3-il)etil]amino]metil] fenil]prop-2-enamida, (E)-N-hidroxi-3-[4-[[2-(2-metil-1H-indol-3-il) etilamino]metil] fenil]prop-2-enamida, N-(2-aminofenil)-N'-fenil-octanodiamida, carbamato de 4-(2-aminofenilcarbamoil)bencilo, 4-acetamido-N-(2-aminofenil)benzamida, N-(2-aminofenil)-4-[[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]metil]benzamida, 3-(dimetilaminometil)-N-[2-[4-(hidroxicarbamoil)fenoxi]etil]-1-benzofuran-2-carboxamida, o {4-[(hidroxiamino)carbonil]fenil}carbamato de {6-[(dietilamino) metil]-2-naftil}metilo, o sales de los mismos.

Otros aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan una composición farmacéutica que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento. En un aspecto, una composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia. En otro aspecto, una composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia. En otro aspecto más, una composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona; y una cantidad eficaz de un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia. La composición farmacéutica divulgada en el presente documento puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otros aspectos adicionales de la presente memoria descriptiva divulgan el uso de un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento o una composición divulgada en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

Otros aspectos más de la presente memoria descriptiva divulgan un método para tratar el cáncer, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona divulgado en el presente documento a un mamífero que lo necesita; y administrar una cantidad eficaz de un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia divulgado en el presente documento a un mamífero que lo necesita; en el que la administración del inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y del compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia reduce un síntoma asociado con el cáncer, tratando de este modo el cáncer. El inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se pueden administrar concurrente o secuencialmente. La administración secuencial de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se pueden administrar con aproximadamente tres horas de diferencia entre sí, con aproximadamente dos horas de diferencia entre sí, o con aproximadamente una hora

de diferencia entre sí. Un ejemplo de un cáncer que se pueden tratar usando los compuestos, composiciones y métodos divulgados en el presente documento incluyen un cáncer de pulmón, un cáncer de cerebro, un cáncer del sistema nervioso central, un cáncer de mama, un cáncer de colon, una leucemia, un mieloma, un cáncer de próstata, o un cáncer de ovario. En aspectos adicionales, el método comprende además administrar una radioterapia.

Otros aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan el uso de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia divulgado en el presente documento o una composición que comprende dichos compuestos tal como se divulga en el presente documento para el tratamiento del cáncer, en el que la administración del inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y del compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia reduce un síntoma asociado con el cáncer, tratando de este modo el cáncer. Un ejemplo de un cáncer que se pueden tratar usando los compuestos, composiciones y métodos divulgados en el presente documento incluyen un cáncer de pulmón, un cáncer de cerebro, un cáncer del sistema nervioso central, un cáncer de mama, un cáncer de colon, una leucemia, un mieloma, un cáncer de próstata, o un cáncer de ovario. En otros aspectos más, el método comprende además administrar radioterapia.

Otros aspectos adicionales de la presente memoria descriptiva divulgan un kit farmacéutico que comprende una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otros aspectos más de la presente memoria descriptiva divulgan un método para tratar el cáncer, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona divulgado en el presente documento a un mamífero que lo necesita; y administrar una cantidad eficaz de una radioterapia divulgada en el presente documento a un mamífero que lo necesita; en el que la administración del inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y la radioterapia reduce un síntoma asociado con el cáncer, tratando de este modo el cáncer. El inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y la radioterapia se pueden administrar concurrente o secuencialmente. La administración secuencial de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y la radioterapia se pueden administrar con aproximadamente tres horas de diferencia entre sí, con aproximadamente dos horas de diferencia entre sí, o con aproximadamente una hora de diferencia entre sí. Un ejemplo no limitativo de un cáncer que se puede tratar usando los compuestos, composiciones y métodos divulgados en el presente documento incluyen un cáncer de pulmón, un cáncer de cerebro, un cáncer del sistema nervioso central, un cáncer de mama, un cáncer de colon, una leucemia, un mieloma, un cáncer de próstata, o un cáncer de ovario.

Otros aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan un uso de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona o una composición que comprende dicho compuesto y una radioterapia divulgados en el presente documento para el tratamiento del cáncer, en el que la administración del inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y la radioterapia reduce un síntoma asociado con el cáncer, tratando de este modo el cáncer. Un ejemplo de un cáncer que se pueden tratar usando los compuestos, composiciones y métodos divulgados en el presente documento incluyen un cáncer de pulmón, un cáncer de cerebro, un cáncer del sistema nervioso central, un cáncer de mama, un cáncer de colon, una leucemia, un mieloma, un cáncer de próstata, o un cáncer de ovario.

El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del organismo humano (o animal) por tratamiento.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Lucantona inhibe la autofagia. Figura 1A. Inducción de lucantona de la formación LC3-II, vacuolización, y LMP. LC3-II se visualizó mediante inmunocitoquímica, vacuolización (flechas) por tinción Giemsa y permeabilización de la membrana lisosómica por pérdida de fluorescencia con naranja de acridina. La microscopia electrónica demuestra la vacuolización y acumulación de partículas electrónicamente densas (fechas), lo que causan la acumulación de proteínas no degradadas. Figura 1B. Cuantificación de la permeabilización de la membrana lisosómica. Media ± desviación estándar, n = 5. *Indica una diferencia significativa entre los controles. $P < 0,05$. Figura 1C. Lucantona estimula la acumulación de SQSTM1/p62. Figura 1D. Lucantona estimula la agregación de SQSTM1/p62 como se muestra visualmente por microscopía de fluorescencia (Figura 1D) y por cuantificación de la fluorescencia relativa (Figura 1E). Figura 1F. Larotaxel, Bafilomicina A1, y la combinación inducen la formación de LC3-II y la acumulación de SQSTM1/p62. Figura 1G. Larotaxel, Bafilomicina A1, y la combinación inducen la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama.

Figura 2. El tratamiento con lucantona y cloroquina reduce la viabilidad celular. Figura 2A. Curva de respuesta a las dosis de lucantona en siete líneas celulares de cáncer de mama. Figura 2B. Curva de respuesta a las dosis de cloroquina en siete líneas celulares de cáncer de mama.

Figura 3. La expresión de catepsina D está fuertemente elevada después del tratamiento con lucantona. Figura 3A. Las matrices de expresión Affymetrics identifican la catepsina D (CTSD) como un gen fuertemente regulado

positivamente en células de cáncer de mama. Figura 3B. Análisis cuantitativo mediante PCR en tiempo real de la expresión de catepsina D en células de cáncer de mama. Media ± desviación estándar, n = 4. *Indica una diferencia significativa entre los controles. P < 0,05. Figura 3C. La lucantona aumenta los niveles de catepsina D y fomenta su agregación.

Figura 4. La inducción de catepsina D contribuye a la apoptosis mediada por lucantona. Figura 4A. La lucantona induce la expresión de catepsina D y la formación de LC3-II. Figura 4B. La lucantona induce la apoptosis en cuatro líneas celulares de cáncer de mama diferentes. Media ± desviación estándar, n = 3. *Indica una diferencia significativa entre controles. P < 0,05. Figura C. La inactivación genética de catepsina D disminuye la apoptosis inducida por lucantona como se muestra mediante inmunotransferencia. Figura D. Cuantificación de la reducción en la apoptosis inducida por lucantona mediante la inactivación genética de la catepsina D. Media ± SD, n = 3. *Indica diferencia significativa con las células transfectadas con ARNip no dianas tratadas con lucantona. P < 0,05.

Figura 5. La lucantona induce la expresión de catepsina D y disminuye la viabilidad celular independientemente de p53. Figura 5A. Las células HCT116 p53+/+ y p53-/- se usaron par evaluar si p53 era necesario para la apoptosis mediada por lucantona. Figura 5B. La lucantona aumenta los niveles de catepsina D en células HCT116 independientemente del estado de p53. Figura 5C. Las células HCT116 p53+/+ y p53-/- son igualmente sensibles a lucantona. Media ± desviación estándar, n = 3.

Figura 6. La lucantona mejora la actividad antineoplásica de Vorinostat. Figura 6A. La combinación de lucantona y vorinostat aumenta los niveles de catepsina D. Figura 6B. Cuantificación de los efectos de lucantona y vorinostat sobre la viabilidad de células de cáncer de mama. Media ± desviación estándar, n = 3. *Indica una diferencia significativa comparable a los controles. **Indica una diferencia significativa en comparación con los grupos de monoterapia. P < 0,05. Figura 6C. La lucantona mejora la apoptosis mediada por vorinostat. Media ± desviación estándar, n = 3. *Indica una diferencia significativa comparable a los controles. **Indica una diferencia significativa en comparación con los grupos de monoterapia. P < 0,05.

Figura 7. La lucantona mejora la actividad antineoplásica de belinostat. Figura 7A. Cuantificación de los efectos de lucantona y belinostat sobre la viabilidad de células de cáncer de mama. Media ± desviación estándar, n = 3. *Indica una diferencia significativa comparable a los controles. **Indica una diferencia significativa en comparación con los grupos de monoterapia. P < 0,05. Figura 7B. La lucantona mejora la apoptosis mediada por belinostat. Media ± desviación estándar, n = 3. *Indica una diferencia significativa comparable a los controles. **Indica una diferencia significativa en comparación con los grupos de monoterapia. P < 0,05. Figura 7C. Curva de respuesta a las dosis de belinostat en células de una línea de células de cáncer de mama MDA-MB-231. Figura 7D. Curva de respuesta a las dosis de belinostat en células de una línea de células de cáncer de mama BT-20.

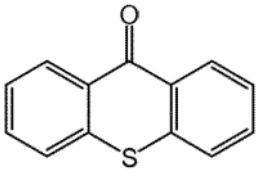
DESCRIPCIÓN

Puesto que el crecimiento celular descontrolado es la causa subyacente de todos los cánceres, los compuestos, composiciones y métodos que reduzcan o prevengan este crecimiento celular descontrolado serían un tratamiento eficaz para el cáncer. La presente memoria descriptiva divulga compuestos, composiciones y métodos que pueden reducir o prevenir el crecimiento celular descontrolado que presentan las células cancerosas. Los compuestos comprenden, en parte, un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona (TAPI) y un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia (CTAPIC). Los TAPI inhiben la supervivencia mediada por autofagia de las células tumorales, haciéndolas más susceptibles al estrés metabólico, hipoxia y tratamientos contra el cáncer, tales como, por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, o terapias dirigidas como la inmunoterapia, terapia hormonal, o terapia con inhibidores de la angiogénesis. Los CTAPIC son agentes quimioterapéuticos convencionales o compuestos terapéuticos dirigidos que, como consecuencia de su mecanismo de acción, inducen autofagia. Sorprendentemente, aunque un TAPI y un CTAPIC tienen efectos opuestos sobre las células tumorales, se ha descubierto que una combinación de compuestos TAPI y HDACI proporciona un efecto sinérgico que aumenta en gran medida el resultado terapéutico beneficioso y proporciona un tratamiento contra el cáncer más eficaz. Como corolario de este hallazgo, un tratamiento combinado de un TAPI y una radioterapia también produciría un tratamiento contra el cáncer sinérgicamente beneficioso ya que la radioterapia también induce la autofagia.

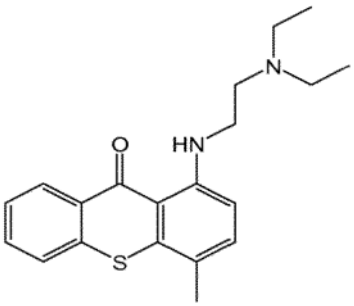
Los aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan, en parte, un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona (TAPI). Como se demuestra en la sección de Ejemplos, un TAPI inhibe la autofagia, altera la función de los lisosomas, induce la expresión de catepsina D, es citotóxico para las células cancerosas, tiene una actividad contra el cáncer que es independiente del estado de p53, y mejora la actividad antineoplásica de los CTAPIC. Un TAPI de utilidad en los métodos divulgados en el presente documento incluye cualquier compuesto a base de tioxantona que tenga unidas cadenas cortas de aspecto similar al anillo del azúcar desoxirribosa sin una base unida y enlace fosfodiéster. Los ejemplos de un TAPI incluyen lucantona (Miracil D), 1-((2-(Dietilamino)etil)amino)-4-metiltioxanten-9-ona, Hicantona 1-(2-dietilaminoetilamino)-4-(hidroximetil)-9-tioxantenona, análogos de indazol de lucantona e hicantona, (WIN33377) N-[[1-[[2-(dietilamino)etil]amino]-9-oxo-9H-tiaxanten-4-il]metil]metanosulfonamida, junto con derivados fisiológicamente tolerados, análogos y sales de los mismos. Otros inhibidores de endonucleasas apurínicos/apirimidínicos de tioxantona se describen en, por ejemplo, Thomas Corbett, *et al., Antitumor Activity of N-[[1-[[2-(diethylamino)ethyl]amino]-9-oxo-9H-thiaxanthen-4-yl]methyl]methanesulfonamide (WIN33377) and Analogues,*

Exp. Opin. Invest. Drugs 3: 1281-1292 (1994); y Mark P. Wentland, *et al.,* Anti-solid Tumor Efficacy and Preparation of N-[[1-[[2-(diethylamino)ethyl]amino]-9-oxo-9H-thiaxanthen-4-yljmethyl]methanesulfonamide (WIN33377) and Related Derivatives, Bioorg. Med. Chem. *Lett*. 4: 609-614 (1994).

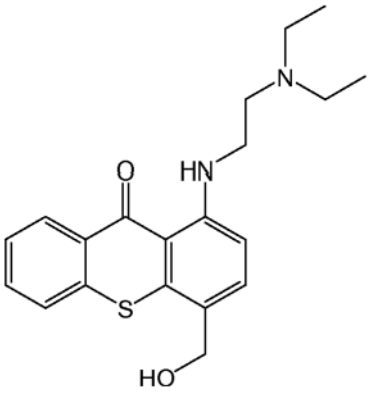
De acuerdo con la invención, el TAPI es 1-((2-(Dietilamino)etil)amino)-4-metiltioxanten-9-ona. También se describen en el presente documento la 1-(2-dietilaminoetilamino)-4-(hidroximetil)-9-tioxantenona y la N-[[1-[[2-(dietilamino)etil]amino]-9-oxo-9H-tiaxanten-4-il]metil]metanosulfonamida. La estructura química de estos compuestos se muestra a continuación.



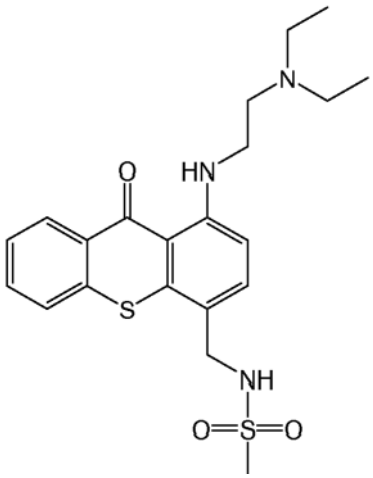
Tioxantenona



Lucantona (Miracil D)
1-((2-(Dietilamino)etil)amino)-4-metiltioxanten-9-ona



Hicantona
1-(2-dietilaminoetilamino)-4-(hidroximetil)-9-tioxantenona



WIN-33377 (SR-233377)
N-[[1-[[2-(dietilamino)etil]amino]-9-oxo-9H-tiaxanten-4-il]metil]metanosulfonamida

Los aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan, en parte, un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia. Un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia (CTAPIC) es una clase de compuestos antineoplásicos útiles en el tratamiento de una amplia gama de cánceres que no obstante inducen autofagia e inhiben por tanto la apoptosis. Muchos compuestos terapéuticos del cáncer inducen autofagia porque inducen daños (quimioterapia citotóxica), estrés metabólico (inhibidores de la angiogénesis, 2-desoxiglucosa), o bloquean rutas de señalización del crecimiento (compuestos no citotóxicos dirigidos, inhibidores de quinasa) imitando la privación de factores o la privación de alimento. Por tanto, un CTAPIC incluye compuestos quimioterapéuticos y compuestos terapéuticos dirigidos tales como compuestos inmunoterapéuticos, compuestos terapéuticos hormonales, o compuestos inhibidores de la angiogénesis. Los ejemplos de dichos compuestos incluyen compuestos antiangiogénicos, inhibidores de la tirosina quinasa, inhibidores del receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), inhibidores de la histona deacetilasa, inhibidores de farnesiltransferasa, inhibidores de mTOR, inhibidores de la glicólisis, y análogos de la vitamina D y compuestos retinoides. Otros CTAPIC incluyen, aunque no de forma limitativa, trióxido de arsénico, Bevacizumab carboplatino I/II, bortezomib, desoxiglucosa, Docetaxel, endostatina, etopósido, Everolimus, gefitinib, imatinib, ixabepilona, Lonafarnib, rapamicina, malato de sunitinib, tamoxifeno, temozolomida, y Temsirolimus.

De acuerdo con la invención, el CTAPIC es un inhibidor de la histona desacetilasa. Los inhibidores de la histona deacetilasa incluyen (inhibidores HDAC, HDACI, o HDI) son una clase de compuestos que interfieren con la función de las HDAC y pueden dar como resultado la hiperacetilación de las histonas, alterando de este modo la expresión génica. Los inhibidores de HDAC se clasifican por sus estructuras químicas y están dotados de diferentes especificidades y afinidades por las HDAC de clases 1, 2, y 4. Entre los inhibidores de HDAC, los más potentes son los inhibidores de HDAC de tipo hidroxamato (tipo de ácido hidroxámico) que presentan una actividad antitumoral dependiente de la dosis contra el cáncer de mama y se han autorizado recientemente como sustancia terapéutica para los linfomas de linfocitos T cutáneos. Los inhibidores de HDAC de tipo hidroxamato de la presente invención son vorinostat y belinostat. En el presente documento también se describen la tricostatina A, M-344, CBHA, Dacinostat y Panobinostat. Otra clase importante de inhibidores de HDAC clínicamente eficaces son los inhibidores de HDAC de tipo benzamida que presentan baja toxicidad y actividad en neoplasias tanto sólidas como hematológicas. Los ejemplos de inhibidores de HDAC de tipo benzamida incluyen Entinostat, Tacedinalina y Mocetinostat. Otras clases de inhibidores de HDAC son ácidos grasos de cadena corta (SCFA) tales como, por ejemplo, fenilbutirato, ácido valproico, y compuestos de ácido alifáticos similares; tetrapéptidos cíclicos que contienen epoxicetona y no epoxicetona tales como, por ejemplo, trapoxina B y depsipéptidos; cetonas electrófilas y moléculas híbridas. SCFA, aunque su uso está generalizado (especialmente el ácido usado valproico) y es clínicamente eficaz, tiene bajas constantes de inhibición de HDAC. Los HDAC de sirtuina de Clase III son dependientes del NAD+ y, por lo tanto, se inhiben mediante nicotinamida, así como por derivados de NAD, dihidrocoumarina, naftopiranona y 2-hidroxinafladehidos. Los inhibidores de HDAC también son potentes sensibilizadores de la radiación.

Las modificaciones epigenéticas son reordenaciones reversibles de la cromatina que, en las células normales, modula la expresión transcripcional de los genes, sin cambiar la secuencia de ADN. La transcripción es una de las etapas que intervienen en la producción de proteínas a partir del ADN. Para que se produzca la transcripción, los factores de transcripción deben unirse a sitios de unión específicos en el ADN. Cuando el ADN está en una forma condensada, es difícil que los factores de transcripción accedan físicamente a sus sitios de unión análogo, con el resultado final de que esto se produce con poca frecuencia.

Las histonas son proteínas que desempeñan un papel fundamental en la regulación transcripcional de los genes. Estas proteínas globulares tienen un extremo N flexible que normalmente está cargado positivamente debido a la presencia

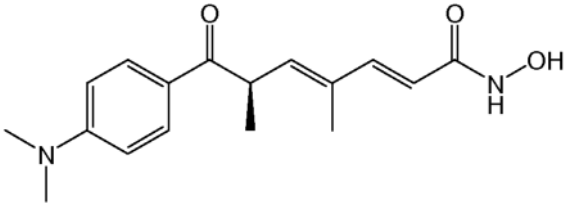
de restos lisina y arginina. Estas cargas positivas ayudan a la porción del extremo N de las histonas a interactuar con y a unirse a los grupos fosfato cargados negativamente de la estructura principal del ADN. Es esta interacción histona-ADN la que ayuda a condensar el ADN en su forma de cromatina compacta como cromosomas. Por lo tanto, asegurando que el ADN está enrollado en su forma condensada, las histonas juegan un papel importante en restringir la unión de los factores de transcripción al ADN.

La unión de las histonas al ADN se controla mediante varias enzimas presentes en la célula. En condiciones donde transcripción de un determinado gen está soportada, enzimas conocidas como histona acetiltransferasas (HAT), o lisina desacetilasas (KDAC), añaden grupos acetilo a los restos de ε-N-acetil lisina en las histonas. La acetilación neutraliza las cargas positivas en la región del extremo N de las histonas, con la consecuencia de que las histonas acetiladas ya no pueden interaccionar con la cadena principal de ADN. Esta disminución en la unión permite la expansión de la cromatina (o la descondensación de la cromatina), lo que permite que se realice la transcripción génica porque los factores de transcripción pueden acceder ahora a sus sitios de unión al ADN y activan la transcripción génica. En condiciones donde transcripción de un gen deja de estar soportada, enzimas conocidas como histona desacetilasas (HDAC) eliminan el grupo acetilo añadido por las HAT. La desacetilación aumenta la carga positiva en el extremo N de las histonas, fomentando de esta forma la unión de alta afinidad entre las histonas y la cadena principal del ADN. La condensación de la cromatina resultante evita la transcripción génica porque los factores de transcripción están físicamente bloqueados y no pueden interaccionar con sus sitios de unión al ADN. Por lo tanto, las HAT facilitan la descondensación de la cromatina y de esta forma fomentan la transcripción génica, mientras que las HDAC facilitan la condensación de la cromatina y de esta forma suprimen la transcripción génica.

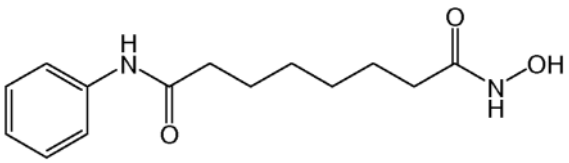
Existen 18 HDAC humanas conocidas, agrupadas en cuatro clases en función de la función y la similitud de la secuencia de ADN de sus dominios accesorios. Las primeras dos clases se consideran las HDAC "clásicas" cuyas actividades se inhiben mediante la tricostatina A (TSA), mientras que el tercer grupo es una familia de proteínas dependientes de NAD+ no afectadas por la TSA. La cuarta clase se considera una categoría atípica basándose solamente en las diferencias en la secuencia de ADN con las demás. La clase I incluye HDAC1, HDAC2, HDAC3, y HDAC8 y tiene homología con la levadura 3 de dependencia reducida del potasio (RPD3). HDAC4, HDAC5, HDAC7, y HDAC9 pertenecen a la clase II y tienen homología con la histona desacetilasa 1 (HDA1) de levadura. HDAC6 y HDAC10 contienen dos sitios catalíticos y se clasifican como de clase IIa. La clase III, también conocida como sirtuinas, están relacionados con la SIR2 e incluyen SIRT1-7, mientras que HDAC11 se coloca en clase IV porque tiene restos conservados en su centro catalítico que están compartidos por ambas clases I y clase II de las HDAC.

Se sabe que varios compuestos antineoplásicos actúan como inhibidores de HDAC. Por tanto, se cree que la inhibición de la condensación de cromatina podría proporcionar un efecto terapéuticamente beneficioso para el tratamiento del cáncer puesto que dicha remodelación de la cromatina da como resultado 1) la supresión transcripcional de los genes reguladores clave de la apoptosis y el ciclo celular, que de esta forma promueven la detención del ciclo celular y la apoptosis; 2) aumento de la heterocigosidad tumoral, y/o 3) inhibición de la angiogénesis. Por lo tanto, la regulación epigenética de la transcripción génica a través de la condensación de la cromatina ha aparecido como un importante mecanismo que conduce a la tumorogénesis.

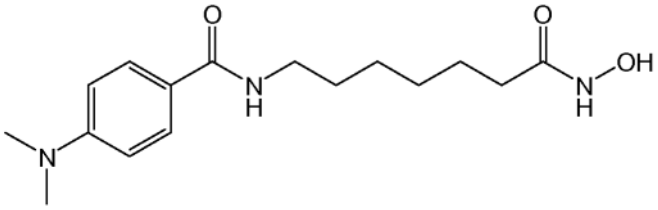
De acuerdo con la invención, el inhibidor de la histona desacetilasa es N-hidroxi-N'-feniloctanediamida o (2E)-3-[3-(anilinosulfonil)fenil]-N-hidroxiacrilamida. Se describen también en el presente documento, (2E,4E,6R)-7-(4-dimetilaminofenil)-N-hidroxi-4,6-dimetil-7-oxohepta-2,4-dienamida, 4-Dimetilamino-N-(6-hidroxicarbamoilhexil)-benzamida, N-hidroxi-3-[(E)-3-(hidroxiamino)-3-oxoprop-1-enil] benzamida, ((E)-N-hidroxi-3-[4-[[2-hidroxietil-[2-(1H-indol-3-il)etil]amino]metil]fenil]prop-2-enamida, (E)-N-hidroxi-3-[4-[[2-(2-metil-1H-indol-3-il)etilamino]metil]fenil]prop-2-enamida, N-(2-aminofenil)-N'-fenil-octanodiamida, carbamato de 4-(2-aminofenilcarbamoil)bencilo, 4-acetamido-N-(2-aminofenil)benzamida, N-(2-aminofenil)-4-[[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]metil]benzamida, 3-(dimetilaminometil)-N-[2-[4-(hidroxicarbamoil)fenoxi]etil]-1-benzofuran-2-carboxamida, o {4-[(hidroxiamino)carbonil]fenil}carbamato de {6-[(dietilamino) metil]-2-naftil}metilo. La estructura química de dichos inhibidores se muestra a continuación.



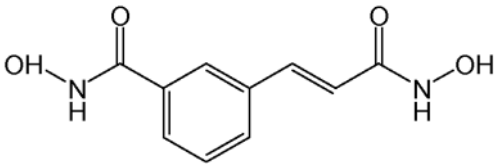
Tricostatina A
(2E,4E,6R)-7-(4-dimetilaminofenil)-N-hidroxi-4,6-dimetil-7-oxohepta-2,4-dienamida



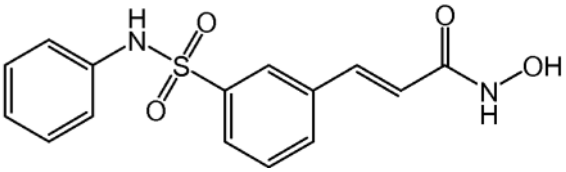
Vorinostat (SAHA, Zolinza)
N-hidroxi-N'-feniloctanediamida



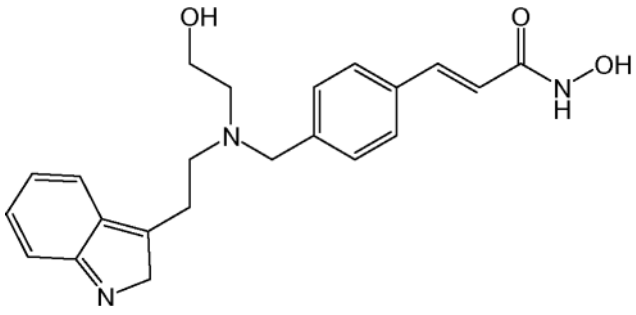
M-344 (D-237)
4-Dimetilamino-N-(6-hidroxicarbamoilhexil)-benzamida



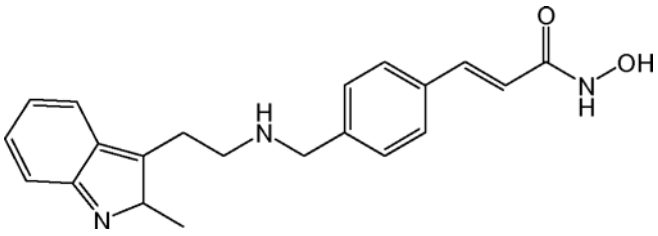
CBHA
N-hidroxi-3-[(E)-3-(hidroxiamino)-3-oxoprop-1-enil]benzamida



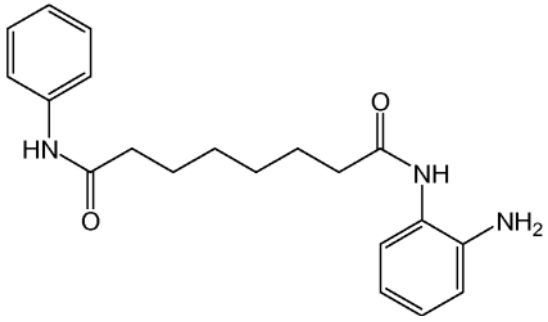
belinostat (PXD-101), PX-105684)
(2E)-3-[3-(anilinosulfonyl)fenil]-N-hidroxiacrilamida



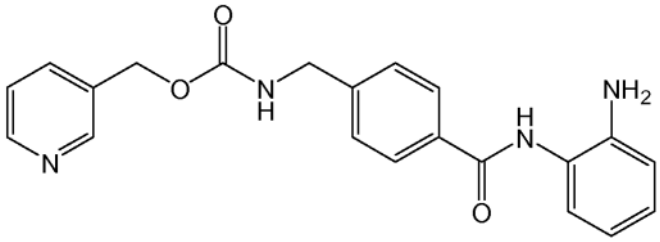
Dacinostat (LAQ-824, NVP-LAQ824),
((E)-N-hidroxi-3-[4-[[2-hidroxietil-[2-(1H-indol-3-il)etil]amino]metil]fenil]prop-2-enamida



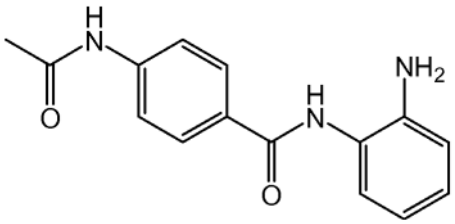
Panobinostat (LBH-589, NVP-LBH589)
(E)-N-hidroxi-3-[4-[[2-(2-metil-1H-indol-3-il)etilamino]metil]fenil]prop-2-enamida



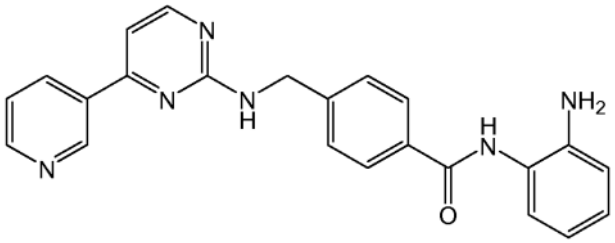
BML-210
N-(2-aminofenil)-N'-fenil-octanediamida



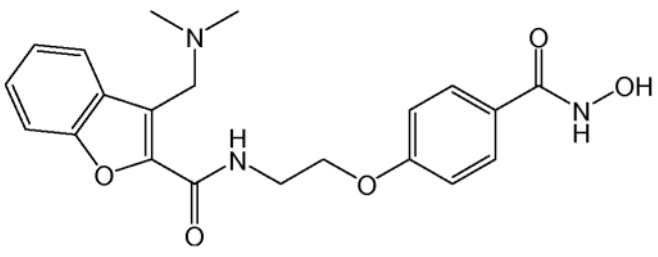
Entinostat (MS-275, SNDX-275, MS-27-275)
carbamato de 4-(2-aminofenilcarbamoil)bencilo



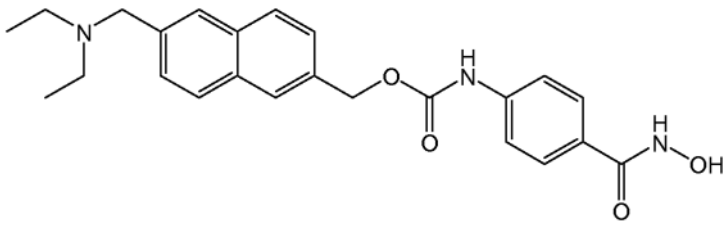
Tacedinalina (CI-994, PD-123654, GOE-5549)
4-acetamido-N-(2-aminofenil)benzamida



Mocetinostat (MGCD-0103)
N-(2-aminofenil)-4-[[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]metil]benzamida



PCI-24781
3-(dimetilaminometil)-N-[2-[4-(hidroxicarbamoil)fenoxi]etil]-1-benzofuran-2-carboxamida



ITF-2357
{4-[(hidroxiamino)carbonil]fenil}carbamato de {6-[(dietilamino)metil]-2-naftil}metilo

Los aspectos de la presente memoria descriptiva, divulgan, en parte, un compuesto terapéutico dirigido. Un compuesto terapéutico dirigido, incluye un compuesto inmunoterapéutico, un compuesto terapéutico hormonal, y un compuesto inhibidor de la angiogénesis. La terapia hormonal implica la manipulación del sistema endocrino mediante la administración exógena de hormonas específicas, especialmente hormonas esteroideas, o fármacos que inhiben la producción o la actividad de dichas hormonas (antagonistas de hormonas). Puesto que las hormonas esteroideas son potentes controladores de la expresión génica en algunas células cancerosas, el cambio en los niveles o en la actividad de determinadas hormonas puede hacer que cese el crecimiento de algunos cánceres, o incluso experimenten muerte celular. La eliminación quirúrgica de órganos endocrinos, como la orquiectomía y ooforectomía también se puede utilizar como una forma de terapia hormonal.

Las inmunoterapias son tratamientos que utilizan sustancias corporales o fármacos naturales fabricados a partir de sustancias naturales del organismo. Estimulan el organismo para atacar las células cancerosas cara y superar los efectos secundarios producidos por otros tratamientos contra el cáncer. Las inmunoterapias utilizan el sistema inmunitario para rechazar el cáncer. La premisa principal es estimular el sistema inmunitario del paciente para atacar las células tumorales malignas que son responsables de la enfermedad. Esto se puede conseguir bien mediante la inmunización del paciente, en cuyo caso, el propio sistema inmunitario del paciente se entrena para reconocer las células tumorales como objetivos a destruir, o mediante la administración de anticuerpos terapéuticos como fármacos, en cuyo caso, el sistema inmunitario del paciente se recluta para destruir las células tumorales mediante los anticuerpos terapéuticos.

Las composiciones divulgadas en el presente documento pueden comprender, o no, cualquier número y combinación de inhibidores de la autofagia basados en tioxantona y los compuestos terapéuticos contra el cáncer inductores de la autofagia divulgados en el presente documento. Por ejemplo, una composición puede comprender dos o más inhibidores de la autofagia basados en tioxantona y/o compuestos terapéuticos contra el cáncer inductores de autofagia, tres o más inhibidores de la autofagia basados en tioxantona y/o compuestos terapéuticos contra el cáncer inductores de autofagia, cuatro o más inhibidores de la autofagia basados en tioxantona y/o compuestos terapéuticos contra el cáncer inductores de autofagia, o cinco o más inhibidores de la autofagia basados en tioxantona y/o compuestos terapéuticos contra el cáncer inductores de autofagia.

Un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia divulgados en el presente documento, o una composición que comprende dicho compuesto o compuestos se administra por lo general a un individuo como una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar combinando una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto como se divulga en el presente documento, o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo, como principio activo, con excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales, y mediante la preparación de formas farmacéuticas unitarias adecuadas para su uso terapéutico. Como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una concentración terapéuticamente eficaz de un principio activo, tales como, por ejemplo, cualquiera de los compuestos divulgados en el presente documento. Preferentemente, la composición farmacéutica no produce una reacción adversa, alérgica, ni ninguna otra reacción no esperada o indeseada cuando se administra a un individuo. Una composición farmacéutica divulgada en el presente documento es útil en aplicaciones médicas y veterinarias. Una combinación farmacéutica se puede administrar a un individuo en solitario, o en combinación con otros principios activos suplementarios, agentes, fármacos u hormonas. Las composiciones farmacéuticas se pueden fabricar usando cualquiera de varios procesos, que incluyen mezclado convencional, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento y liofilización. La composición farmacéutica puede tomar cualquiera de varias formas que incluyen una solución estéril, suspensión, emulsión, liofilizado, comprimido, píldora, aglomerado, cápsula, polvo, jarabe, elixir, o cualquier otra forma farmacéutica adecuada para su administración.

Las formas farmacéuticas líquidas adecuadas para inyección parenteral pueden comprender disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones y polvos estériles para reconstitución en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso. Los ejemplos de vehículos, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no

acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol (PEG), y glicerol), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. En las formulaciones líquidas, una cantidad terapéuticamente eficaz está comprendida de forma típica entre aproximadamente un 0,0001 % (p/v) a aproximadamente un 50 % (p/v), preferentemente de aproximadamente un 0,001 % (p/v) a aproximadamente un 1,0 % (p/v).

Las formas farmacéuticas sólidas adecuadas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el principio activo se puede premezclar con al menos un excipiente (o portador) habitual tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico o (a) cargas o extensores, como, por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes, como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y acacia, (c) hidratantes, como, por ejemplo, glicerol, (d) agentes disgregantes, como, por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos complejos y carbonato de sodio, (e) retardantes de la disolución, como, por ejemplo, parafina, (f) aceleradores de la absorción, como, por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes, como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) adsorbentes, como, por ejemplo, caolín y bentonita, y (i) lubricantes, como, por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio o sus mezclas. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. En las formulaciones sólidas, una cantidad terapéuticamente eficaz está comprendida de forma típica entre aproximadamente 0,001 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg.

Una composición farmacéutica divulgada en el presente documento puede opcionalmente incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable que facilite el procesamiento de un principio activo para dar composiciones farmacéuticamente aceptables. Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que, dentro del alcance del buen criterio médico, son adecuados para su contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas proporcionales a una relación razonable de beneficio/riesgo. Como se usa en el presente documento, la expresión “vehículo farmacológicamente aceptable" es un sinónimo de “vehículo farmacológico" y se refiere a cualquier vehículo que no tenga sustancialmente ningún efecto perjudicial a largo plazo o permanente, y abarca términos tales como "vehículo, estabilizante, diluyente, aditivo, auxiliar, o excipiente farmacológicamente aceptable" Dicho vehículo generalmente se mezcla con un principio activo o permite diluir o encerrar el principio activo y puede ser un agente sólido, semisólido o líquido. Se entiende que los principios activos pueden ser solubles o se pueden administrar como suspensión en el vehículo o diluyente deseado. Cualquiera de varios vehículos farmacéuticamente aceptables se puede usar incluidos medios acuosos tales como, por ejemplo, agua, solución salina, glicina, ácido hialurónico; vehículos sólidos tales como, por ejemplo, almidón, estearato de magnesio, manitol, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, carbonato de magnesio; disolventes; medios de dispersión; recubrimientos; agentes antibacterianos y antifúngicos; agentes isotónicos y agentes de retraso de la absorción. La selección de un vehículo farmacológicamente aceptable puede depender del modo de administración. Salvo cuando un vehículo farmacológicamente aceptable sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de usos específicos de dichos vehículos farmacéuticos se pueden encontrar en Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (Howard C. Ansel et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 7ª ed. 1999); Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Alfonso R. Gennaro ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 20ª ed. 2000); Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (Joel G. Hardman et al., eds., McGraw-Hill Professional, 10ª ed. 2001); y Handbook of Pharmaceutical Excipients (Raymond C. Rowe et al., APhA Publications, 4ª edición 2003).

Una composición farmacéutica divulgada en el presente documento puede opcionalmente incluir otros componentes farmacéuticamente aceptables (o componentes farmacéuticos), incluidos tampones, conservantes, reguladores de la tonicidad, sales, antioxidantes, agentes reguladores de la osmolalidad, sustancias fisiológicas, sustancias farmacológicas, agentes espesantes, agentes emulsionantes, agentes mojantes, y agentes edulcorantes o aromatizantes. Se pueden usar diversos tampones y medios para ajustar el pH para preparar una composición farmacéutica divulgada en el presente documento, siempre que la preparación resultante sea farmacéuticamente aceptable. Dichos tampones incluyen tampones de acetato, tampones de borato, tampones de citrato, tampones de fosfato, solución salina tamponada neutra y solución salina tamponada con fosfato. Se entiende que se pueden usar ácidos o bases para ajustar el pH de una composición según se necesite. Los antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, acetilcisteína, hidroxianisol butilado e hidroxitolueno butilado. Los conservantes antimicrobianos útiles incluyen cloruro de benzalconio, clorobutanol, timerosal, acetato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, una composición de oxicloro estabilizado, tales como, por ejemplo, clorito de sodio y quelantes, tales como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida, calcio DTPA, y CaNaDTPA-bisamida. Los reguladores de la tonicidad útiles en una composición farmacéutica incluyen sales tales como, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol o glicerina, y otros reguladores de la tonicidad farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica se puede proporcionar como una sal que se puede formar con muchos ácidos, incluidos clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros disolventes protónicos que las correspondientes formas de bases libres. Se entiende que

estas y otras sustancias conocidas en la técnica de la farmacopea se pueden incluir en una composición farmacéutica útil en la invención.

Un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia divulgados en el presente documento también se pueden incorporar a una plataforma de administración de fármacos con el fin de conseguir un perfil de liberación del compuesto controlado en el tiempo. Dicha plataforma de administración de fármacos comprende un compuesto divulgado en el presente documento dispersado en al interior de una matriz de polímero, de forma típica, una matriz de polímero biodegradable, bioerosionable y/o biorresorbible. Como se usa en el presente documento, el término "polímero" se refiere a homopolímeros o copolímeros sintéticos, homopolímeros o copolímeros de origen natural, así como modificaciones sintéticas o derivados de los mismos que tengan una estructura lineal, ramificada o en estrella. Los copolímeros pueden estar dispuestos en cualquier forma, tales como, por ejemplo, aleatoria, en bloques, segmentada, bloques protegidos, injerto o tribloque. Por lo general, los polímeros son polímeros de condensación. Los polímeros se pueden modificar adicionalmente para mejorar sus propiedades mecánicas o de degradación mediante la introducción de agentes reticulantes o cambiando la hidrofobicidad de los restos laterales. Si están reticulados, los polímeros están reticulados habitualmente menos de un 5 %, reticulados habitualmente menos de un 1 %.

Los polímeros adecuados incluyen alginatos, poliésteres alifáticos, oxalatos de polialquileno, poliamidas, poliamidoésteres, polianhídridos, policarbonatos, poliésteres, polietilenglicol, ácidos carboxílicos polihidroxialifáticos, poliortoésteres, polioxaésteres, polipéptidos, polifosfacenos, polisacáridos y poliuretanos. El polímero habitualmente comprende al menos un 10 % (p/p), al menos aproximadamente un 20 % (p/p), al menos aproximadamente un 30 % (p/p), al menos aproximadamente un 40 % (p/p), al menos aproximadamente un 50 % (p/p), al menos aproximadamente un 60 % (p/p), al menos aproximadamente un 70 % (p/p), al menos aproximadamente un 80 % (p/p) o al menos aproximadamente un 90 % (p/p) de la plataforma de administración de fármacos. Los ejemplos de polímeros biodegradables, bioerosionables y/o biorreabsorbibles y métodos para fabricar una plataforma de administración de fármacos se describen en, por ejemplo, Drost, *et. al., Controlled Release Formulation,* patente de Estados Unidos 4.756.911; Smith, *et. al., Sustained Release Drug Delivery Devices,* patente de Estados Unidos 5.378.475; Wong y Kochinke, *Formulation for Controlled Release of Drugs by Combining Hyrophilic and Hydrophobic Agents,* patente de Estados Unidos 7.048.946; Hughes, *et. al., Compositions and Methods for Localized Therapy of the Eye,* publicación de patente de Estados Unidos 2005/0181017; Hughes, *Hypotensive Lipid-Containing Biodegradable Intraocular Implants and Related Methods,* publicación de patente de Estados Unidos 2005/0244464; Altman, *et al., Silk Fibroin Hydrogels and Uses Thereof*, publicación de patente de Estados Unidos 2011/0008437.

En aspectos de esta realización, un polímero que comprende la matriz es un polipéptido tal como fibroína de seda, queratina o colágeno. En otros aspectos de esta realización, un polímero que comprende la matriz es un polisacárido tal como celulosa, agarosa, elastina, quitosana, quitina, o un glucosaminoglucano tal como sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, sulfato de queratán, o ácido hialurónico. En otros aspectos más de esta realización, un polímero que comprende la matriz es un poliéster tal como ácido D-láctico, ácido L-láctico, ácido láctico racémico, ácido glicólico, caprolactona y combinaciones de los mismos.

Un experto en la materia aprecia que la selección de un polímero adecuado para formar una plataforma de administración de fármacos divulgada depende de varios factores. Los factores más relevantes en la selección del uno o más polímeros adecuados, incluyen la compatibilidad del polímero con el fármaco, cinética de liberación deseada del fármaco, cinética de biodegradación deseada de la plataforma en el sitio de implante, cinética bioerosionable deseada de la plataforma en el sitio del implante, cinética biorresorbible deseada de la plataforma en el sitio del implante, comportamiento mecánico *in vivo* de la plataforma, temperaturas de procesamiento, biocompatibilidad de la plataforma y tolerancia del paciente. Otros factores relevantes que, hasta cierto punto, dictan el comportamiento *in vitro* e *in vivo* del polímero incluyen la composición química, distribución espacial de los componentes, el peso molecular del polímero y el grado de cristalinidad.

Una plataforma de administración de fármacos incluye tanto una plataforma de administración de fármacos de liberación sostenida como una plataforma de administración de fármacos de liberación prolongada. Como se usa en el presente documento, la expresión "liberación sostenida" se refiere a la liberación de un compuesto divulgado en el presente documento durante un período de aproximadamente siete días o más. Como se usa en el presente documento, la expresión "liberación prolongada" se refiere a la liberación de un compuesto divulgado en el presente documento durante un período de tiempo de menos de aproximadamente siete días.

En aspectos de esta realización, una plataforma de administración de fármacos de liberación libera un compuesto divulgado en el presente documento sustancialmente con una cinética de liberación de primer orden durante un período de aproximadamente 7 días después de la administración, aproximadamente 15 días después de la administración, aproximadamente 30 días después de la administración, aproximadamente 45 días después de la administración, aproximadamente 60 días después de la administración, aproximadamente 75 días después de la administración o aproximadamente 90 días después de la administración. En otros aspectos de esta realización, una plataforma de administración de fármacos de liberación libera un compuesto divulgado en el presente documento sustancialmente con una cinética de liberación de primer orden durante un período de, por ejemplo, al menos 7 días después de la administración, al menos 15 días después de la administración, al menos 30 días después de la

administración, al menos 45 días después de la administración, al menos 60 días después de la administración, al menos 75 días después de la administración o al menos 90 días después de la administración.

En aspectos de esta realización, una plataforma de administración de fármacos libera un compuesto divulgado en el presente documento sustancialmente con una cinética de liberación de primer orden durante un período de aproximadamente 1 día después de la administración, aproximadamente 2 días después de la administración, aproximadamente 3 días después de la administración, aproximadamente 4 días después de la administración, aproximadamente 5 días después de la administración o aproximadamente 6 días después de la administración. En otros aspectos de esta realización, una plataforma de administración de fármacos libera un compuesto divulgado en el presente documento sustancialmente con una cinética de liberación de primer orden durante un período de como máximo 1 día después de la administración, como máximo 2 días después de la administración, como máximo 3 días después de la administración, como máximo 4 días después de la administración, como máximo 5 días después de la administración o como máximo 6 días después de la administración.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan, en parte, un kit farmacéutico que incluye una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, un cáncer. Los inhibidores de la autofagia basados en tioxantona, compuestos terapéuticos contra el cáncer inductores de autofagia, las composiciones que comprenden dichos compuestos, y los métodos divulgados en el presente documento pueden ser útiles para tratar cualquier cáncer. El cáncer es un grupo de más de 100 enfermedades en las que un grupo de las células presentan una proliferación descontrolada en el cuerpo del mamífero y, de esta forma, se trata fundamentalmente de una enfermedad que afecta al mecanismo de regulación que el organismo utiliza para controlar la división y el crecimiento celular. En la mayoría de los casos, las células cancerosas forman un aglomerado de células que se denomina tumor, aunque en algunos cánceres, como la leucemia, las células no forman tumores. Los tumores pueden ser malignos o benignos. Además, los tumores malignos (o cánceres) comprenden células con material genético anómalo y habitualmente experimentan un crecimiento celular rápido descontrolado, invaden y destruyen el tejido adyacentes, y a veces se diseminan a otras ubicaciones del cuerpo a través de la linfa o la sangre (es decir, metástasis). El cáncer se asocia con una elevada incidencia de mortalidad porque si la invasión y metástasis de las células cancerosas a través del cuerpo no se detiene, las células cancerosas invadirán órganos vitales y producirán la disfunción de los órganos y eventualmente la muerte. Las propiedades malignas de los cánceres las diferencias de los tumores benignos, que habitualmente son de crecimiento lento y autolimitados, no invaden ni metastatizan y, de esta forma, por lo general no suponen una amenaza para la vida. Los cánceres en la etapa loca, regional o distante se consideran invasivos. Un cáncer muy temprano que aparece solamente como unas pocas capas de células, denominado cáncer in situ, se considera no invasivo.

El cáncer es una clase diversa de enfermedades que difieren ampliamente en sus causas y en su biología. Los cánceres están producidos por varios factores que trabajan solos o en combinación. Algunos cánceres están producidos por factores externos tales como el tabaco, la dieta, algunos productos químicos, la radiación, y virus. Otros cánceres están producidos por factores internos tales como hormonas, enfermedades inmunitarias, y mutaciones genéticas hereditarias. Habitualmente pasan diez o más años entre la exposición a un factor que provoca cáncer y la enfermedad detectable.

Los cánceres se clasifican por lo general según el tipo de célula a la que se asemeja al tumor y, por lo tanto, el supuesto tejido que es el origen del tumor. Los carcinomas son tumores malignos derivados de células epiteliales. Este grupo representa los tipos de cáncer más frecuentes, incluidas las formas comunes de cáncer de pulmón, un cáncer de cerebro, un cáncer del sistema nervioso central, un cáncer de mama, un cáncer de colon, una leucemia, un mieloma, un cáncer de próstata y un cáncer de ovario. Los sarcomas son tumores malignos derivados de tejido conectivo, o células mesenquimales. Los blastomas suelen ser tumores malignos que se parecen a tejido inmaduro o embrionario. Muchos de estos tumores son más frecuentes en los niños. Los linfomas y leucemias son neoplasias malignas derivadas de células hematopoyéticas (formadoras de la sangre). Finalmente, los tumores de células germinales son tumores derivados de células totipotentes. En los adultos, se encuentran frecuentemente en el testículo y el ovario; en los fetos, bebés, y niños pequeños, se encuentran con más frecuencia en la línea media corporal, especialmente en la punta del coxis. Por tanto, como se usa en el presente documento, el término "cáncer" incluye un cáncer primario y un cáncer metastásico que puede ser un carcinoma, un sarcoma, un linfoma, una leucemia, un blastoma, o un tumor de células germinales.

Los aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, la reducción de un síntoma asociado con el cáncer. En un aspecto de esta realización, el síntoma reducido es un aumento en la velocidad de crecimiento de las células cancerosas. En otro aspecto de dicha realización, el síntoma reducido es un aumento en la velocidad de división celular de las células cancerosas. En otro aspecto más de esta realización, el síntoma reducido es un aumento en la extensión de la invasión de las células cancerosas a los tejidos u órganos adyacentes. En otro aspecto adicional de esta realización, el síntoma reducido es un aumento en la extensión de la metástasis. En un aspecto adicional de esta realización, el síntoma reducido es un aumento de la angiogénesis. En un aspecto más de esta realización, el síntoma

reducido es una disminución de la apoptosis. En un aspecto adicional más de la presente divulgación, el síntoma reducido es una disminución en la muerte celular o necrosis celular. Por lo tanto, un tratamiento que utiliza los compuestos, composiciones y métodos divulgados en el presente documento disminuirá la velocidad de crecimiento de las células cancerosas, disminución de la velocidad de división celular de las células cancerosas, disminución en la extensión de la invasión de las células cancerosas a los tejidos u órganos adyacentes, disminución de la extensión de la metástasis, disminución en la angiogénesis, aumento de la apoptosis, y/o aumento en la muerte celular y/o necrosis celular.

Los aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, un mamífero. Un mamífero incluye un ser humano, y un ser humano puede ser un paciente. Otros aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, un individuo. Un individuo incluye un ser humano, y un ser humano puede ser un paciente.

Los aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, administrar una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "administrar" significa cualquier mecanismo de administración que proporcione una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento a un individuo que potencialmente dé como resultado un resultado beneficioso cínico, terapéutico o experimental.

Una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento se pueden administrar concurrentemente o secuencialmente. Por tanto, la composición que comprende un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona se puede administrar a la vez que una composición que comprende un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia (concurrentemente) o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos temporales. Asimismo, concurrentemente tal como se usa puede significar que un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se pueden tomar conjuntamente a la vez como parte de una composición farmacéutica o conjuntamente a la vez pero en composiciones farmacéuticas independientes. Por lo tanto, cada componente puede administrarse separadamente pero lo suficientemente cerca en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico deseado. Como alternativa, la administración de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia puede ser con aproximadamente una hora de diferencia entre sí, con aproximadamente dos horas de diferencia entre sí, o con aproximadamente tres horas de diferencia entre sí.

Una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento se puede administrar durante uno o más ciclos. En una realización, un ciclo comprende siete veces una vez cada cuatro días.

La administración de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento incluye varios enfoques enterales o parenterales que incluyen la administración oral en cualquier forma aceptable, tal como comprimido, líquido, cápsula y polvo; administración tópica en cualquier forma aceptable, tales como gotas, pulverización, cremas, geles o pomadas; administración bucal, nasal, y/o mediante inhalación en cualquier forma aceptable; administración rectal en cualquier forma aceptable; administración vaginal en cualquier forma aceptable; administración intravascular en cualquier forma aceptable, tal como la inyección intravenosa en bolo, infusión intravenosa, inyección de bolo intraarterial, infusión intraarterial e instilación mediante catéter en la vasculatura; administración peritisular e intratisular en cualquier forma aceptable, tal como inyección intraperitoneal, inyección intramuscular, inyección subcutánea, infusión subcutánea, inyección intraocular, inyección retinal o inyección subretinal o inyección epidural; administración intravesicular en cualquier forma aceptable, tal como la instilación mediante catéter; y mediante un dispositivo de colocación, tal como un implante, una endoprótesis vascular, un parche, un microgránulo, un catéter, una bomba osmótica, un supositorio, un sistema de administración bioerosionable, un sistema de administración no bioerosionable u otro sistema implantado de liberación prolongada o ralentizada. Una lista ilustrativa de polímeros biodegradables y métodos de uso de los mismos se describe en, por ejemplo, *Handbook of Biodegradable Polymers* (Abraham J. Domb et al., eds., Overseas Publishers Association, 1997).

Una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento se puede administrar a un mamífero usando varias vías. Las vías de administración adecuadas para un método de tratamiento del cáncer como se divulga en el presente documento incluye administración tanto local como sistémica. La administración local da como resultado significativamente una mayor administración de una composición en una ubicación específica en comparación con todo el cuerpo del mamífero, mientras que, la administración sistémica da como resultado la administración de una composición esencialmente a todo el cuerpo del individuo. Las vías de administración adecuadas para un método de tratamiento del cáncer como se divulga en el presente documento también incluyen la administración central y periférica. La administración central da como resultado la administración de una composición esencialmente al sistema nervioso central del individuo e incluye, por ejemplo, administración intratecal, administración epidural así como la inyección o el implante craneal. La administración periférica da como resultado la administración de una composición a prácticamente cualquier región de un individuo fuera del sistema nervioso central y abarca cualquier vía de administración diferente a la administración directa en la médula espinal o el cerebro. La vía de administración real de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento usada en un mamífero puede determinarse por una persona normalmente experta en la materia teniendo en cuenta factores entre los que se incluyen el tipo de cáncer, la ubicación del cáncer, la causa del

cáncer, la gravedad del cáncer, el grado de alivio deseado, la duración del alivio deseado, el compuesto o compuestos concretos utilizados, la velocidad de excreción del compuesto o compuestos utilizados, la farmacodinámica del compuesto o compuestos utilizados, la naturaleza del resto de compuestos a incluir en la composición, la vía de administración particular, las características particulares, antecedentes clínicos y factores de riesgo del individuo, tales como la edad, el peso, estado de salud general y similares, o cualquier combinación de los mismos.

En una realización, una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento se administra sistémicamente a un mamífero. En otra realización, una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento se administra localmente a un mamífero. En un aspecto de esta realización, una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento se administra a un tumor de un mamífero. En otro aspecto de dicha realización, una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento se administra a la zona que rodea un tumor de un mamífero.

Los aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento. Como se usa en el presente documento, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz" es un sinónimo de "dosis terapéuticamente eficaz" y, cuando se usa en referencia al tratamiento de un cáncer, significa la dosis mínima de un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento necesaria para conseguir el efecto terapéutico deseado e incluye una dosis suficiente como para reducir un síntoma asociado con un cáncer. En aspectos de esta realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento reduce un síntoma asociado con un cáncer en, por ejemplo, al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos al 90 % o al menos el 100 %. En otros aspectos de esta realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento reduce un síntoma asociado con un cáncer en, por ejemplo, como máximo el 10 %, como máximo el 20 %, como máximo el 30 %, como máximo el 40 %, como máximo el 50 %, como máximo el 60 %, como máximo el 70 %, como máximo el 80 %, como máximo el 90 % o como máximo el 100 %. En otros aspectos más de esta realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento reduce un síntoma asociado con un cáncer en, por ejemplo, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 80 %, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 70 %, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 60 %, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 50 %, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 40 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 80 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 20 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 60 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 50 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 40 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 80 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 70 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 60 % o de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 50 %. En otros aspectos más de esta realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento es la dosificación suficiente para reducir un síntoma asociado con un cáncer durante al menos una semana, al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos diez meses, al menos once meses, o al menos doce meses.

La cantidad de principio activo en la composición y el método para tratar el cáncer puede variar de manera que se obtenga una dosificación adecuada. La cantidad terapéuticamente eficaz real de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento a administrar a un mamífero puede determinarse por una persona normalmente experta en la materia teniendo en cuenta factores entre los que se incluyen el tipo de cáncer, la ubicación del cáncer, la causa del cáncer, la gravedad del cáncer, la duración del tratamiento, el grado de alivio deseado, la duración del alivio deseado, el compuesto o compuestos concretos utilizados, la velocidad de excreción del compuesto o compuestos utilizados, la farmacodinámica del compuesto o compuestos utilizados, la naturaleza del resto de compuestos a incluir en la composición, la vía de administración particular, las características particulares, antecedentes clínicos y factores de riesgo del individuo, tales como la edad, el peso, estado de salud general y similares, la respuesta del individuo al tratamiento, o cualquier combinación de los mismos. Una cantidad de dosificación eficaz del compuesto activo puede determinarse fácilmente por tanto por una persona normalmente experta en la materia teniendo en cuenta todos los criterios y utilizando su mejor criterio sobre el bienestar el individuo.

De manera adicional, cuando se usa una administración repetida de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento, la cantidad efectiva real de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento dependerá además de una serie de factores, entre los que se incluyen la frecuencia de administración, la semivida de la composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento, o cualquier combinación de los mismos. Una persona normalmente experta en la materia sabe que una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento se puede extrapolar de ensayos *in vitro* y de estudios de administración *in vivo*

usando modelos animales antes de su administración a seres humanos. Se esperan amplias variaciones en la cantidad necesaria eficaz a la vista de las diferentes eficacias de las diversas vías de administración. Por ejemplo, se espera por lo general que la administración oral requiera una dosificación más alta que la administración por inyección intravenosa o intravítrea. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar usando rutinas empíricas normalizadas de optimización, que son bien conocidas de una persona normalmente experta en la materia. Los niveles de dosificación terapéutica eficaz precisos, así como las pautas, se determinan preferentemente por el médico responsable del paciente teniendo en consideración los factores anteriormente identificados.

Como ejemplo, cuando se administra una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento a un mamífero, una cantidad terapéuticamente eficaz está generalmente comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 100,0 mg/kg. En aspectos de esta realización, una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento puede ser de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg, de aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 3,0 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 3,0 mg/kg o de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3,0 mg/kg. En otros aspectos más de esta realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento puede ser de al menos 0,001 mg/kg, al menos 0,01 mg/kg, al menos 0,1 mg/kg, al menos 1,0 mg/kg, al menos 10 mg/kg, o al menos 100 mg/kg. En otros aspectos más de esta realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento puede ser como máximo de 0,001 mg/kg, como máximo 0,01 mg/kg, como máximo 0,1 mg/kg, como máximo 1,0 mg/kg, como máximo 10 mg/kg, o como máximo 100 mg/kg.

La dosificación puede ser una dosificación única o acumulada (dosificación en serie), y se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento de un cáncer puede comprender una administración una vez de una dosis eficaz de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento. Como ejemplo, una dosis eficaz de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento se puede administrar una vez a un mamífero como una sola inyección o deposición en o cerca del sitio que presenta un síntoma de un cáncer o una única administración oral del fármaco. Como alternativa, el tratamiento de un cáncer puede comprender múltiples administraciones de una dosis eficaz de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento realizadas durante un intervalo de periodos de tiempo, tales como diariamente, una vez cada pocos días, semanalmente, mensualmente o anualmente. Como ejemplo, una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento se puede administrar una o dos veces a la semana a un mamífero. El momento de administración puede variar de un mamífero a otro, dependiendo de factores tales como la gravedad de los síntomas del mamífero. Por ejemplo, una dosis eficaz de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento se puede administrar a un mamífero una vez al mes durante un periodo de tiempo indefinido, o hasta que el mamífero ya no requiera la terapia. Una persona normalmente experta en la materia reconocerá que la dolencia del mamífero se puede supervisar durante el ciclo de tratamiento y que la cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento que se administra se puede ajustar en consecuencia.

La administración combinada, tanto concurrentemente como secuencialmente, de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia proporciona un efecto terapéutico sinérgico que es beneficioso para el tratamiento de un cáncer tal como se divulga en el presente documento. Un efecto terapéutico sinérgico es aquel donde un síntoma asociado con el cáncer se reduce en un grado mayor cuando los compuestos o composiciones divulgados en el presente documento se administran combinados, en oposición a cuando los mismos compuestos se administran por separado. En aspectos de esta realización, la administración de un compuesto o composición divulgado en el presente documento en combinación reduce un síntoma asociado con el cáncer en, por ejemplo, al menos un 10 % más, al menos un 20 % más, al menos un 30 % más, al menos un 40 % más, al menos un 50 % más, al menos un 60 % más, al menos un 70 % más, al menos un 80 % más, al menos un 90 % más o al menos un 100 % más con respecto a la administración de bien el mismo inhibidor de la autofagia a base de tioxantona o el mismo compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia solo.

Una composición que comprende un compuesto o compuestos divulgados en el presente documento tal como se divulga en el presente documento también se puede administrar a un mamífero junto con otros compuestos terapéuticos par aumentar el efecto terapéutico global del tratamiento. El uso de múltiples compuestos para tratar una indicación puede aumentar los efectos beneficiosos al mismo tiempo que se reduce la presencia de efectos secundarios.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan, en parte, una radioterapia. En una realización, un método para tratar el cáncer mediante la administración de un TAPI y CTAPIC divulgados en el presente documento puede comprender además administrar una radioterapia. Una radioterapia puede administrarse antes, después, o durante la administración de los compuestos y composiciones divulgados en el presente documento. En otra realización, un método para tratar el cáncer comprende administrar un TAPI y una radioterapia, pero no un CTAPIC.
La radiación se puede administrar de diversas formas. Por ejemplo, la radiación puede ser de tipo electromagnético o en forma de partículas. La radiación electromagnética útil incluye rayos X y rayos gamma. Se pueden utilizar rayos X

de tensión elevada (rayos x >=4 MeV). La radiación en forma de partículas útil incluye haces de electrones, haces de protones, haces de neutrones, partículas alfa y mesones pi negativos. La radiación se puede administrar usando aparatos y métodos convencionales para el tratamiento radiológico, y por métodos intraquirúrgicos y estereotácticos. Se puede encontrar una discusión adicional sobre los tratamientos por radiación adecuados para su uso en Steven A. Leibel *et al.,* Textbook of Radiation Oncology (1998) (publ. W. B. Saunders Company), y especialmente en los Capítulos 13 y 14. La radiación también se puede administrar por otros métodos tales como la administración dirigida, por ejemplo, por "semillas" radioactivas, o mediante la administración sistémica de conjugados radiactivos dirigidos. J. Padawer *et al.,* Combined Treatment with Radioestradiol Lucanthone in Mouse C3HBA Mammary Adenocarcinoma and with Estradiol Lucanthone in an Estrogen Bioassay, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 7:347-357 (1981). Se pueden usar otros métodos de administración de radiación.

La cantidad de radiación administrada al volumen de tratamiento deseado puede ser variable. La radiación se puede administrar en una cantidad eficaz para producir la detención o la regresión del cáncer de un sistema nervioso central de un hospedador, cuando la radiación se administra con un compuesto o compuestos, o composiciones divulgadas en el presente documento. Como alternativa, la radiación se administra en fracciones de al menos aproximadamente 1 Gray (Gy) al menos una vez en días alternos hasta un volumen de tratamiento y, más preferentemente, la radiación se administra en fracciones de al menos aproximadamente 2 Gray (Gy) al menos una vez al día hasta un volumen de tratamiento, o la radiación se administra en fracciones de al menos aproximadamente 2 Gray (Gy) al menos una vez al día durante cinco días consecutivos a la semana. Como alternativa, la radiación se administra en fracciones de al menos aproximadamente 3 Gray (Gy) en días alternos, tres veces a la semana hasta un volumen de tratamiento. Como alternativa, las primeras 23 fracciones se administran hasta un volumen de tratamiento inicial, mientras que otras 7 fracciones de tratamiento se administran a un volumen de tratamiento de refuerzo. Como alternativa, un total de al menos aproximadamente 20 Gy, aún más preferentemente al menos aproximadamente 30 Gy, lo más preferible al menos aproximadamente 60 Gy de radiación se administran a un hospedador que lo necesita. Como alternativa, la radiación se administra a la totalidad del encéfalo, en lugar de a un volumen de tratamiento. Cuando se irradia el encéfalo completo, se recomienda una dosificación máxima de 30 Gy. Como alternativa, la radiación se administra a la totalidad del encéfalo de un hospedador, en el que el hospedador se está tratando de cáncer metastásico.

El volumen de tratamiento comprende una lesión potenciadora del contraste en una exploración por TC o IRM, más preferentemente, una lesión potenciadora del contraste y el edema circundante, aún más preferiblemente una lesión potenciadora del contraste y el edema circundante en una exploración por TC o IRM, con además 1 cm de margen.

Los planes de tratamiento pueden incluir los campos contrapuestos laterales, una pareja de campos en cuña, rotación, o técnicas multicampo. Se sugiere la planificación del tratamiento guiada por TC para mejorar la precisión en la selección de las disposiciones de campo. Se sugieren para todos los pacientes, distribuciones isodosis para el volumen de tratamiento inicial y un volumen de tratamiento en cono descendente, incluidos aquellos con campos contrapuestos paralelos. Son deseables planos compuestos que muestren la distribución de dosis en el volumen de tratamiento inicial y en el volumen de tratamiento de refuerzo. La dosis mínima y máxima emitida al volumen de tratamiento se mantiene preferentemente en aproximadamente un 10 % de la dosis en el centro del volumen de tratamiento.

Algunos aspectos de la presente divulgación también se pueden describir de la siguiente forma:

1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona.

2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto terapéutico contra cáncer inductor de la autofagia.

3. Una composición farmacéutica que comprende:

a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona; y

b) una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia.

4. La composición de las realizaciones 1-3, en la que la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. La composición de las realizaciones 1, 3, o 4, en la que el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona es 1-((2-(Dietilamino)etil)amino)-4-metiltioxanten-9-ona, 1-(2-dietilaminoetilamino)-4-(hidroximetil)-9-tioxantenona, N-[[1-[[2-(dietilamino)etil]amino]-9-oxo-9H-tiaxanten-4-il]metil]metanosulfonamida, análogos de indazol de los mismos, o sales de los mismos.

6. La composición de las realizaciones 2-4, en el que el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia es un trióxido de arsénico, un etopósido, una rapamicina, un inhibidor de la histona desacetilasa, inhibidores de tirosina quinasa, un tamoxifeno, una temozolomida, un imatinib, o un bortezomib.

7. La composición de la realización 6, en el que el inhibidor de la histona desacetilasa es un inhibidor de la histona desacetilasa de tipo hidroxamato o un inhibidor de la histona desacetilasa de tipo benzamida.

8. La composición de la realización 6, en el que el inhibidor de la histona desacetilasa es (2E,4E,6R)-7-(4-dimetilaminofenil)-N-hidroxi-4,6-dimetil-7-oxohepta-2,4-dienamida, N-hidroxi-N'-feniloctanediamida, 4-Dimetilamino-N-(6-hidroxicarbamoilhexil)-benzamida, N-hidroxi-3-[(E)-3-(hidroxiamino)-3-oxoprop-1-enil]benzamida, (2E)-3-[3-(anilinosulfonyl)fenil]-N-hidroxiacrilamida, ((E)-N-hidroxi-3-[4-[[2-hidroxietil-[2-(1H-indol-3-il)etil]amino]metil]fenil]prop-2-enamida, (E)-N-hidroxi-3-[4-[[2-(2-metil-1H-indol-3-il)etilamino]metil]fenil]prop-2-enamida, N-(2-aminofenil)-N'-fenil-octanodiamida, carbamato de 4-(2-aminofenilcarbamoil} bencilo, 4-acetamido-N-(2-aminofenil)benzamida, N-(2-aminofenil)-4-[[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]metil] benzamida, 3-(dimetilaminometil)-N-[2-[4-(hidroxicarbamoil)fenoxi]etil]-1-benzofuran-2-carboxamida, o {4-[(hidroxiamino)carbonil]fenil}carbamato de {6-[(dietilamino) metil]-2-naftil}metilo.

9. Un uso de una composición de acuerdo con las realizaciones 1-8 para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

10. Un método para tratar el cáncer, comprendiendo el método

a) administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona de las realizaciones 1 o 3-6 a un mamífero que lo necesita; y

b) administrar una cantidad eficaz de un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia de las realizaciones 2-6 a un mamífero que lo necesita;

en el que la administración del inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y del compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia reduce un síntoma asociado con el cáncer, tratando de este modo el cáncer.

11. Un uso de una composición de acuerdo con las realizaciones 1-8 para el tratamiento del cáncer, en el que la administración del inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y del compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia reduce un síntoma asociado con el cáncer, tratando de este modo el cáncer.

12. El método de la realización 10 o el uso de la realización 11, en el que el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se pueden administrar concurrentemente.

13. El método de la realización 10 o el uso de la realización 11, en el que el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se pueden administrar secuencialmente.

14. El método o el uso de la realización 13, en el que el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se administran con aproximadamente tres horas de diferencia entre sí.

15. El método o el uso de la realización 13, en el que el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se administran con aproximadamente dos horas de diferencia entre sí.

16. El método o el uso de la realización 13, en el que el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se administran con aproximadamente una hora de diferencia entre sí.

17. El método de la realización 10 o el uso de la realización 11, en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y la cantidad terapéuticamente eficaz. del compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se administran en una sola dosis diaria o dividida en mas de una dosis diaria.

18. El método o el uso de la realización 17, en el que dicha más de una dosis diaria es dos dosis diarias.

19. El método de la realización 10 o el uso de la realización 11, en el que el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se administran por vía oral.

20. El método de la realización 10 o el uso de la realización 11, en el que el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se administran por vía parenteral.

21. El método de la realización 10 o el uso de la realización 11, en el que el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se administran en forma de una

cápsula o comprimido.

22. El método de la realización 10 o el uso de la realización 11, en el que el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se administran durante uno o más ciclos.

23. El método de la realización 10 o el uso de la realización 11, en el que dicho un ciclo comprende 7 veces cada 4 días.

24. El método de las realizaciones 10, o 12-23 el uso de las realizaciones 11-23, en el que el cáncer es un cáncer de pulmón, un cáncer de cerebro, un cáncer del sistema nervioso central, un cáncer de mama, un cáncer de colon, una leucemia, un mieloma, un cáncer de próstata, o un cáncer de ovario.

25. El método o el uso de la realización 24, en el que el cáncer de pulmón es carcinoma de pulmón no microcítico.

26. El método o uso de las realizaciones 10-25, en el que el método o uso comprende además administrar radioterapia, terapia hormonal o inmunoterapia.

27. Un kit farmacéutico que comprende:

a) una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y
b) una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

28. Un método para tratar el cáncer, comprendiendo el método

a) administrar una cantidad eficaz de a inhibidor de la autofagia a base de tioxantona de las realizaciones 1, 4, o 5 a un mamífero que lo necesita; y

b) administrar una cantidad eficaz de una radiación ionizante a un mamífero que lo necesita;

en el que la administración del inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y la radiación ionizante reduce un síntoma asociado con el cáncer, tratando de este modo el cáncer.

29. Un método para tratar el cáncer, comprendiendo el método

a) administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona de las realizaciones 1 o 3-6 a un mamífero que lo necesita;

b) administrar una cantidad eficaz de un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia de las realizaciones 1, 4, o 6-8 a un mamífero que lo necesita; y

c) administrar una cantidad eficaz de una radiación ionizante a un mamífero que lo necesita;

en el que la administración del inhibidor de la autofagia a base de tioxantona, el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia, y la radiación ionizante reduce un síntoma asociado con el cáncer, tratando de este modo el cáncer.

31. Un uso de una composición de acuerdo con las realizaciones 1, 4, o 5 para el tratamiento del cáncer a un mamífero que lo necesita, en el que la administración del inhibidor de la autofagia a base de tioxantona, junto con la administración de una cantidad eficaz de una radiación ionizante, reduce un síntoma asociado con el cáncer, tratando de este modo el cáncer.

32. Un uso de una composición de acuerdo con las realizaciones 1-8 para el tratamiento del cáncer a un mamífero que lo necesita, en el que la administración del inhibidor de la autofagia a base de tioxantona, el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia, o ambos, junto con la administración de una cantidad eficaz de una radiación ionizante, reduce un síntoma asociado con el cáncer, tratando de este modo el cáncer.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se proporcionan con fines ilustrativos para facilitar una comprensión más completa de las realizaciones representativas ahora contempladas.

Ejemplo 1

La lucantona inhibe la degradación autofágica

La lucantona induces la permeabilización de la membrana lisosómica (LMP). La autofagia fomenta la supervivencia celular y produce resistencia a fármacos permitiendo que las células cancerosas reciclen componentes celulares para generar ATP. De acuerdo con esto, la inhibición de la autofagia bien de forma genética o usando compuestos como 3-MA potencia la actividad de muchos agentes antineoplásicos. La lucantona es un agente antiesquistoma que, según su estructura química, podría alterar negativamente la función lisosómica e inhibir la última etapa de la degradación autofágica. Para analizar esta hipótesis, células de cáncer de mama se trataron con lucantona o cloroquina y se sometieron a ensayo para determinar la acumulación de LC3-II, un aumento en la vacuolización, y el aspecto de la permeabilización de la membrana lisosómica.

La acumulación de LC3-II se visualizó mediante inmunohistoquímica. Células de una línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 se sembraron sobre portas de cámara y se dejaron adherir durante la noche. A continuación, las células se trataron durante 48 horas con lucantona 10 µM o cloroquina 50 µM. Después del tratamiento con fármaco, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se permeabilizaron utilizando TRITON-X-100 al 0,2 %, y se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios indicados. Se usaron anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488 fluorescentes para visualizar la localización de las proteínas. Las imágenes se capturaron con un microscopio fluorescente Olympus (Center Valley, P A) con una cámara DP71 y un objetivo 60X. El programa informático Image-Pro Plus Versión 6.2.1 (MediaCybernetics, Bethesda, MD) se usó para la adquisición de imágenes.

El aumento de la vacuolización se visualizó mediante tinción Giemsa y microscopía de transición electrónica. Células de una línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 se sembraron sobre portas de cámara y se trataron con lucantona 10 µM o cloroquina 50 µM durante 48 horas. Después del tratamiento con fármaco, las células se lavaron con PBS y se fijaron en metanol durante 5 minutos. A continuación, las células se incubaron durante 1 hora colorante Giemsa diluido 1:20 con agua desionizada. Las células se enjuagaron con agua y se obtuvieron imágenes con un microscopio fluorescente Olympus. El programa informático Image-Pro Plus Versión 6.2.1 se usó para la adquisición de imágenes. La microscopía de transmisión electrónica de las células se realizó usando procedimientos rutinarios. Las secciones se cortaron con un micro tomo LKB Ultracut (Leica, Deerfield, IL), se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1230 (JEOL, EE.UU., Inc., Peabody, MA). Las imágenes se capturaron con el AMT Imaging System (Advanced Microscopy Techniques Corp, Danvers, MA).

El aspecto del LMP se supervisó mediante la pérdida de fluorescencia con naranja de acridina. Los lisosomas ácidos se visualizaron mediante tinción con naranja de acridina. Después del tratamiento con lucantona 10 µM o cloroquina 50 µM durante 48 horas, las células de una línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 se tiñeron con naranja de acridina 1 µM durante 15 minutos a 37 °C. Las células se lavaron con PBS y las imágenes se capturaron con un microscopio fluorescente Olympus. Según la acidez, los lisosomas aparecían como vesículas citoplásmicas de color naranja fluorescente. La cuantificación de 5 campos aleatorios de intensidad de naranja de acridina se midió por inmunofluorescencia y la adquisición de imágenes se realizó usando el programa informático Image-Pro Plus Versión 6.2.1.

La lucantona indujo modificaciones de lípidos de LC3-I a LC3-II, que se caracteriza por la localización puntiforme de LC3 en los autofagosomas (Figura 1B). La lucantona también indujo la vacuolización citoplasmática, que es característica de la permeabilización de la membrana lisosómica y de la autofagia (Figura 1B). Además, la lucantona disminuyó la intensidad de la tinción de color rojo de los lisosomas con naranja de acridina que indica una pérdida de acidez lisosómica después del tratamiento, con cloroquina y lucantona (Figura 1B y 1C).

La inhibición de la autofagia da como resultado la acumulación de proteínas. La lucantona o cloroquina indujeron una acumulación de partículas densas en electrones cuando visualiza mediante microscopía de transmisión electrónica, lo que sugiere la agregación de proteínas (Figura 1B). Para confirmar este hallazgo, las células de cáncer de mama se trataron con lucantona o cloroquina y se sometieron a ensayo para determinar la proteína de unión a poliubiquitina p62 o secuestosoma I (SQSTMI). Esta proteína se degrada por autofagia, se localiza en los cuerpos de inclusión celular, y se ha propuesto que desempeña un papel facilitando el aclaramiento de agregados de proteína por autofagia. Por tanto, una perturbación de este proceso daría como resultado la acumulación de SQSTMI/p62.

Los niveles de agregación de SQSTMI/p62 se determinaron mediante inmunotransferencia e inmunocitoquímica, respectivamente. Para la inmunotransferencia, células de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 se sembraron incubaron con lucantona 10 µM o cloroquina 50 µM durante 48 horas. Las células se recogieron y posteriormente se lisaron usando procedimientos rutinarios. Aproximadamente 50 µg de proteína total celular de cada muestra se sometieron a SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, y las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5 % en una solución salina tamponada con Tris que contenía TWEEN-20 al 0,1 % durante 1 hora. Las transferencias se sondearon durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios, se lavaron, y se sondearon con anticuerpos secundarios específicos de la especie y se acoplaron con peroxidasa de rábano

picante. El material inmunorreactivo se detectó por quimioluminiscencia potenciada (West Pico, Pierce, Inc., Rockville, IL).

De forma consistente con otros marcadores de la inhibición de la autofagia, los niveles de SQSTMI/p62 aumentaron fuertemente después del tratamiento con lucantona (Figura 1D). La inmunocitoquímica reveló que SQSTMI/p62 mostró un patrón de tinción difuso en condiciones basales, pero se agregó en respuesta a la lucantona. Estos resultados indican que lucantona estimula la acumulación y la agregación de SQSTM1/p62, un efecto que concuerda con su interacción notificada con las proteínas ubiquitinadas (Figura 1D).

Ejemplo 2

La lucantona es citotóxica para las células de cáncer de mama

Se ha notificado que la permeabilización de la membrana lisosómica y la posterior inhibición de la autofagia inducen la muerte celular en células cancerosas. Para investigar la actividad antineoplásica de lucantona, se midió la viabilidad celular en un ensayo MTT usando un panel de siete líneas celulares de cáncer de mama.

Las células de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, HCC1954, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-435, HCC1937, y BT-20 se sembraron en placas de microcultivo de 96 pocillos a 10.000 células por pocillo y se dejaron adherir durante 24 horas. A continuación, las células se trataron con concentraciones variables de lucantona o cloroquina durante 72 horas. Después del tratamiento con fármaco, se añadió bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,difeniltetrazolio (MTT) y la viabilidad celular se cuantificó con un lector de microplacas BioTek (Winooski, VT). Los efectos proapoptóticos tras exposición a fármacos *in vitro* se cuantificaron mediante tinción con yoduro de propidio (IP) y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para el análisis del contenido de ADN del sub-G_0/G_1. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. Los valores de CI_{50} se calcularon a partir de los resultados de los ensayos MTT.

La lucantona redujo la viabilidad celular en una medida similar en un panel de siete líneas celulares de cáncer de mama (Figura 2). Además, una comparación directa reveló que lucantona era significativamente más potente que CQ a la hora de reducir la viabilidad celular con un valor promedio de la CI_{50} de 7,2 µM versus 66 µM para CQ (Figura 2).

Ejemplo 3

La lucantona induce la expresión de catepsina D

Caracterización de los efectos de la lucantona sobre las células cancerosas mediante matrices de expresión Affymetrix. Para caracterizar adicionalmente los efectos de la lucantona sobre las células de cáncer de mama, se realizó un perfilado de la expresión sobre líneas celulares de cáncer de mama. Las células de una línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 y un BT-20 se trataron con lucantona 10 µM durante 48 horas. El ARN total se aisló usando el Mini kit RNeasy (Qiagen, Germantown, MD) y se trató con TURBO DNA-free™ Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). 300 ng de ARN total por muestra se amplificaron y se hibridaron en matrices GENECHIP® Human Gene 1.0 ST (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estas matrices analizan la expresión de aproximadamente 28.869 genes bien referenciados con 764.885 sondas diferentes. Los archivos Affymetrix CEL se importaron a la PARTEK® Genomics Suite™ 6.4 (Partek Inc., St. Louis, MO) usando los parámetros predeterminados de normalización Partek y los análisis de promedio multimatriz sólido (RMA) se ajustaron a la secuencia de la sonda y el contenido de GC (GC-RMA). Se realizó la normalización de los datos para todas las matrices usando normalización de cuantiles. Se identificaron los genes sobrerregulados significativamente ($p<0,05$ y > aumento de 4 veces). Los datos representan los genes sobrerregulados al menos 4 veces después del tratamiento con lucantona.

De los genes inducidos por lucantona, la catepsina D (CTSD), la metaloproteinasas de la matriz I (MMPI), y el citocromo P450, familia 1, miembro Al (CYPIAl) aumentaron en ambas líneas celulares (Figura 3A).

Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de la catepsina D. La catepsina D de la proteasa lisosómica es un mediador clave de la apoptosis y su liberación al citosol se considera que fomenta la muerte celular. Teniendo en cuenta esto, los investigadores evaluaron adicionalmente el papel de la catepsina D durante la muerte celular mediada por lucantona usando PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Para realizar la qRT-PCR, las células de líneas celulares MDA-MB-231 o BT-20 se trataron con lucantona 10 µM durante 48 horas y después se recogieron para su análisis. El ARN total se aisló usando el Mini kit RNeasy (Qiagen, Germantown, MD) y se trataron con TURBO DNAfree™ Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). La síntesis de la primera hebra del ADNc se realizó a partir de 1 µg de ARN en 20 µl de mezcla de reacción usando el kit de transcripción inversa, de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los transcritos de catepsina D y GAPDH se amplificaron usando los ensayos de expresión comercialmente disponibles TaqMan@ Gene (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los niveles de los ARNm se normalizaron a la expresión de GAPDH y la expresión génica relativa se calculó con el método $2^{-\Delta Ct}$.

La PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) confirmó que la lucantona indujo un aumento significativo en los niveles de catepsina D en ambas líneas celulares (Figura 3B). Además, la lucantona también aumentó de forma importante los niveles de proteína Catepsina D y fomentó su agregación citosólica, tal como se mide mediante inmunocitoquímica (Figura 3C).

Ejemplo 4

La inducción de Catepsina D contribuye a la apoptosis mediada por lucantona

Expresión de Catepsina D en el cáncer de mama. Puesto que la Catepsina D contribuye significativamente a la apoptosis mediada por lucantona, se investigó la expresión de la catepsina D mediante inmunotransferencia y apoptosis por Pi-FAC en cuatro líneas celulares de cáncer de mama. Las células de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, BT-474, SKBR-3, y BT-20 se sembraron en placas de microcultivo de 96 pocillos a 10.000 células por pocillo y se dejaron adherir durante 24 horas. A continuación, las células se trataron con lucantona 10 µM durante 72 horas (48 horas para el ensayo de apoptosis). Para la inmunotransferencia, las células se recogieron después del tratamiento, y se determinaron los niveles de catepsina D como se ha descrito anteriormente. Los efectos proapoptóticos tras exposición a fármacos *in vitro* se cuantificaron mediante tinción con yoduro de propidio (IP) y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para el análisis del contenido de ADN del sub-G_0/G_1. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. Como cabía esperar, los niveles de catepsina D estaban fuertemente aumentados después del tratamiento con lucantona (Figura 4A) y se correlacionaron con la apoptosis (Figura 4B).

La inactivación genética de Catepsina D disminuye la apoptosis inducida por lucantona. Para establecer adicionalmente el papel mecanicista de la catepsina D en la apoptosis inducida por lucantona, se usó un ARNip para inactivar genéticamente su expresión (Figura 4C). La preparación de los ARNip de la catepsina D y de la combinación de ARNip no dirigida SMARTpool se obtuvieron de Dharmacon (Lafayette, CO). Las células de una línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 se transfectaron con 100 nM de bien el ARNip no dirigido o el ARNip de catepsina D usando Oligofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células transfectadas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y después se trataron con lucantona 10 µM durante 48 horas. La eficacia del ARNi se midió a las 48 horas mediante inmunotransferencia utilizando un anticuerpo contra α-catepsina D. La apoptosis se determinó mediante tinción PI y citometría de flujo. Los resultados indican que las células con niveles reducidos de catepsina D fueron significativamente menos sensibles a la apoptosis mediada por lucantona (Figura 4D).

Ejemplo 5

p53 no disminuye la acumulación de catepsina D ni la actividad de lucantona

La pérdida de función del p53 es un evento frecuente en e´l cáncer humano que se ha asociado con la tumorigénesis y la resistencia farmacológica. Por lo tanto, son muy deseables agentes que tenga eficacia independientemente del estado del p53. Para investigar el papel del p53 en la muerte celular mediada por lucantona, líneas celulares de cáncer colorrectal p53+1$^+$ y p53-1$^-$ HCT116 isogénicas (Figura 5A). De manera importante, la lucantona indujo la acumulación de catepsina D igualmente independientemente del estado del p53 (Figura 5B). Consistente con la inducción equipotente de catepsina D, la lucantona redujo la viabilidad en una medida similar en ambas líneas de células HCT116 p53+1$^+$ y p53-1$^-$ - (Figura 5C). Por tanto, la pérdida de p53 no disminuye la acumulación de catepsina D ni la actividad de lucantona.

Ejemplo 6

La lucantona potencia la actividad de Vorinostat

Puesto que la lucantona inhibe la autofagia, es posible que también potencie la actividad de agentes quimioterapéuticos que inducen esta ruta. El inhibidor de la autofagia a base de tioxantona Vorinostat induce tanto la apoptosis como la autofagia, y la inhibición de la autofagia potencia fuertemente su actividad proapoptótica. Para determinar si una combinación de lucantona y vorinostat sería eficaz, la expresión de la catepsina D mediante inmunotransferencia, la viabilidad celular mediante el ensayo MTT, y la apoptosis mediante PI-FACS se investigaron en cuatro líneas celulares de cáncer de mama.

Las células de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, BT-474, SKBR-3, y BT-20 se sembraron en placas de microcultivo de 96 pocillos a 10.000 células por pocillo y se dejaron adherir durante 24 horas. Para la inmunotransferencia, a continuación, las células se trataron con lucantona 10 µM, vorinostat 2,5 µM, o la combinación durante 72 horas, se recogieron, y los niveles de catepsina D se determinaron como se ha descrito anteriormente. Para el ensayo de viabilidad celular MTT, las células se trataron a continuación con lucantona 10 µM, vorinostat 2,5 µM, o la combinación durante 72 horas. Tras el tratamiento, se añadió bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,difeniltetrazolio (MTT) después del tratamiento y la viabilidad celular se cuantificó con un lector de microplacas BioTek (Winooski, VT). Para el ensayo de la apoptosis, las células se trataron a continuación con lucantona 10 µM,

vorinostat 2,5 µM, o la combinación durante 48 horas. Los efectos proapoptóticos tras exposición a fármacos *in vitro* se cuantificaron mediante tinción con yoduro de propidio (IP) y clasificación celular activada por fluorescencia (FAGS) para el análisis del contenido de ADN del sub-G0/G1. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

La combinación de lucantona y vorinostat produjo una mayor inducción de catepsina D en las células MDA-M8-231 respecto el que se había conseguido con cualquiera de los tratamientos en monoterapia (Figura 6A), lo que se asoció con una disminución en la viabilidad celular (Figura 68) y un aumento de la apoptosis (Figura 6C). Estos proporcionan evidencias de que la inhibición de la autofagia con lucantona puede aumentar con éxito la actividad antineoplásica del vorinostat.

Ejemplo 7

La lucantona potencia la actividad de Belinostat

Para explorar y ampliar adicionalmente los hallazgos de que la lucantona puede aumentar con éxito la actividad antineoplásica de los inhibidores de HDAC, los investigadores investigaron la eficacia de la lucantona junto con otro inhibidor de HDAC, Belinostat, mediante la evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT, y la apoptosis mediante PI-FACS que se investigaron en cuatro líneas celulares de cáncer.

Las células de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-M8-231 y 8T-20 se sembraron en placas de microcultivo de 96 pocillos a 10.000 células por pocillo y se dejaron adherir durante 24 horas. Para el ensayo de viabilidad celular MTT, las células se trataron a continuación con lucantona 5 µM, belinostat 1 µM, o la combinación durante 72 horas. Tras el tratamiento, se añadió bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,difeniltetrazolio (MTT) después del tratamiento y la viabilidad celular se cuantificó con un lector de microplacas BioTek (Winooski, VT). Para el ensayo de la apoptosis, las células se trataron a continuación con lucantona 10 µM, belinostat 1 µM, o la combinación durante 48 horas. Los efectos proapoptóticos tras exposición a fármacos *in vitro* se cuantificaron mediante tinción con yoduro de propidio (IP) y clasificación celular activada por fluorescencia (FAGS) para el análisis del contenido de ADN del sub-G0/G1. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

La combinación de la lucantona y el belinostat dio como resultado una disminución en la viabilidad celular (Figura 7A) y un aumento en la apoptosis (Figura 7B). Estos proporcionan evidencias de que la inhibición de la autofagia con lucantona puede aumentar con éxito la actividad antineoplásica del belinostat.

Salvo que se indique otra cosa, todos los números que expresan una característica, elemento, cantidad, parámetro, propiedad, términos, y otros que se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones están previstos para modificarse en todos los casos por el término "aproximadamente" Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa que la característica, elemento, cantidad, parámetro, propiedad, o término así cualificado abarca un intervalo de más o menos un diez por ciento por encima y por debajo del valor de la citada característica, elemento, cantidad, parámetro, propiedad o término. En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar. Como mínimo, y no en un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada indicación numérica debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos indicados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo habituales. A pesar de que los valores numéricos y valores que exponen el amplio alcance de la invención sean aproximaciones, los intervalos numéricos expuestos en los ejemplos específicos se indican de la forma más precisa posible. Cualquier intervalo o valor numérico, sin embargo, contiene de forma inherente algunos errores que son necesariamente el resultado de la desviación estándar que se encuentra en sus respectivas mediciones de ensayo. Se pretende que la enumeración de intervalos de valores en el presente documento esté destinada meramente a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor numérico individual que se encuentre dentro del intervalo. Salvo que se indique de otra forma en el presente documento, cada valor individual de un intervalo numérico se incorpora a la presente memoria descriptiva como si se hubiera citado individualmente en el presente documento.

Los términos "un", "uno", "el" y referentes similares usados en el contexto para describir la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) debe considerarse inclusivos tanto del plural como del singular, a no ser que se indique otra cosa en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos o de lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento pretende simplemente iluminar mejor la presente invención y no supone una limitación del alcance de la invención tal como fue reivindicada. Ninguna redacción de la presente memoria descriptiva debe tomarse como una indicación de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la divulgación.

Las realizaciones específicas divulgadas en el presente documento pueden estar limitadas adicionalmente en las reivindicaciones utilizando una redacción consistente o esencialmente consistente. Cuando se usa en las reivindicaciones, tanto en las presentadas como en las añadidas por enmienda, el término de transición "que consiste

en" excluye cualquier elemento, etapa, o ingrediente no especificado en las reivindicaciones. El término de transición "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados y a aquellos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s). Las realizaciones de la presente invención reivindicada de esta manera se describen inherentemente o de forma expresa en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona para su uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero, que también se administra simultánea o secuencialmente con un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia, en donde dicho inhibidor de la autofagia a base de tioxantona es lucantona y dicho compuesto inductor de la autofagia es vorinostat o belinostat.

2. El inhibidor de la autofagia a base de tioxantona para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se administran secuencialmente con aproximadamente tres horas de diferencia entre sí, con aproximadamente dos horas de diferencia entre sí o con aproximadamente una hora de diferencia entre sí.

3. El inhibidor de la autofagia a base de tioxantona para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el cáncer es un cáncer de pulmón, preferentemente un carcinoma de pulmón no microcítico, un cáncer de cerebro, un cáncer del sistema nervioso central, un cáncer de mama, un cáncer de colon, una leucemia, un mieloma, un cáncer de próstata, o un cáncer de ovario.

4. El inhibidor de la autofagia a base de tioxantona para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y la cantidad terapéuticamente eficaz. del compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se administran en una sola dosis diaria o dividida en más de una dosis diaria.

5. El inhibidor de la autofagia a base de tioxantona para su uso de acuerdo con la Reivindicación 4, en donde dicha más de una dosis diaria son dos dosis diarias.

6. El inhibidor de la autofagia a base de tioxantona para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se administran por vía oral o parenteral.

7. El inhibidor de la autofagia a base de tioxantona para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se administran en forma de una cápsula o un comprimido.

8. El inhibidor de la autofagia a base de tioxantona para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y el compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia se administran durante uno o más ciclos.

9. El inhibidor de la autofagia a base de tioxantona para su uso de acuerdo con la Reivindicación 8, en donde un ciclo de dicho uno o más ciclos comprende 7 veces cada 4 días.

10. El inhibidor de la autofagia a base de tioxantona para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, que comprende adicionalmente administrar radioterapia.

11. Un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia para su uso en el tratamiento del cáncer de un mamífero que también se administra simultánea o secuencialmente con un compuesto inhibidor de la autofagia a base de tioxantona, en donde dicho inhibidor de la autofagia a base de tioxantona es lucantona y dicho compuesto inductor de la autofagia es vorinostat o belinostat.

12. Una composición farmacéutica que comprende:

a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona, en donde dicho inhibidor de la autofagia a base de tioxantona es lucantona;
b) una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia, en donde dicho compuesto inductor de la autofagia es vorinostat o belinostat; y
c) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

13. Un kit farmacéutico que comprende:

a) una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la autofagia a base de tioxantona y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicho inhibidor de la autofagia a base de tioxantona es lucantona, y
b) una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicho compuesto inductor de la autofagia es vorinostat o belinostat.

14. El inhibidor de la autofagia a base de tioxantona para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho compuesto inductor de la autofagia es vorinostat.

15. El inhibidor de la autofagia a base de tioxantona para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho compuesto inductor de la autofagia es belinostat.

16. El compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia para su uso de acuerdo con la Reivindicación 11, en donde dicho compuesto inductor de la autofagia es vorinostat.

17. El compuesto terapéutico contra el cáncer inductor de la autofagia para su uso de acuerdo con la Reivindicación 11, en donde dicho compuesto inductor de la autofagia es belinostat.

18. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho compuesto inductor de la autofagia es vorinostat.

19. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que dicho compuesto inductor de la autofagia es belinostat.

20. El kit de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho compuesto inductor de la autofagia es vorinostat.

21. El kit de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho compuesto inductor de la autofagia es belinostat.

FIG. 1A.

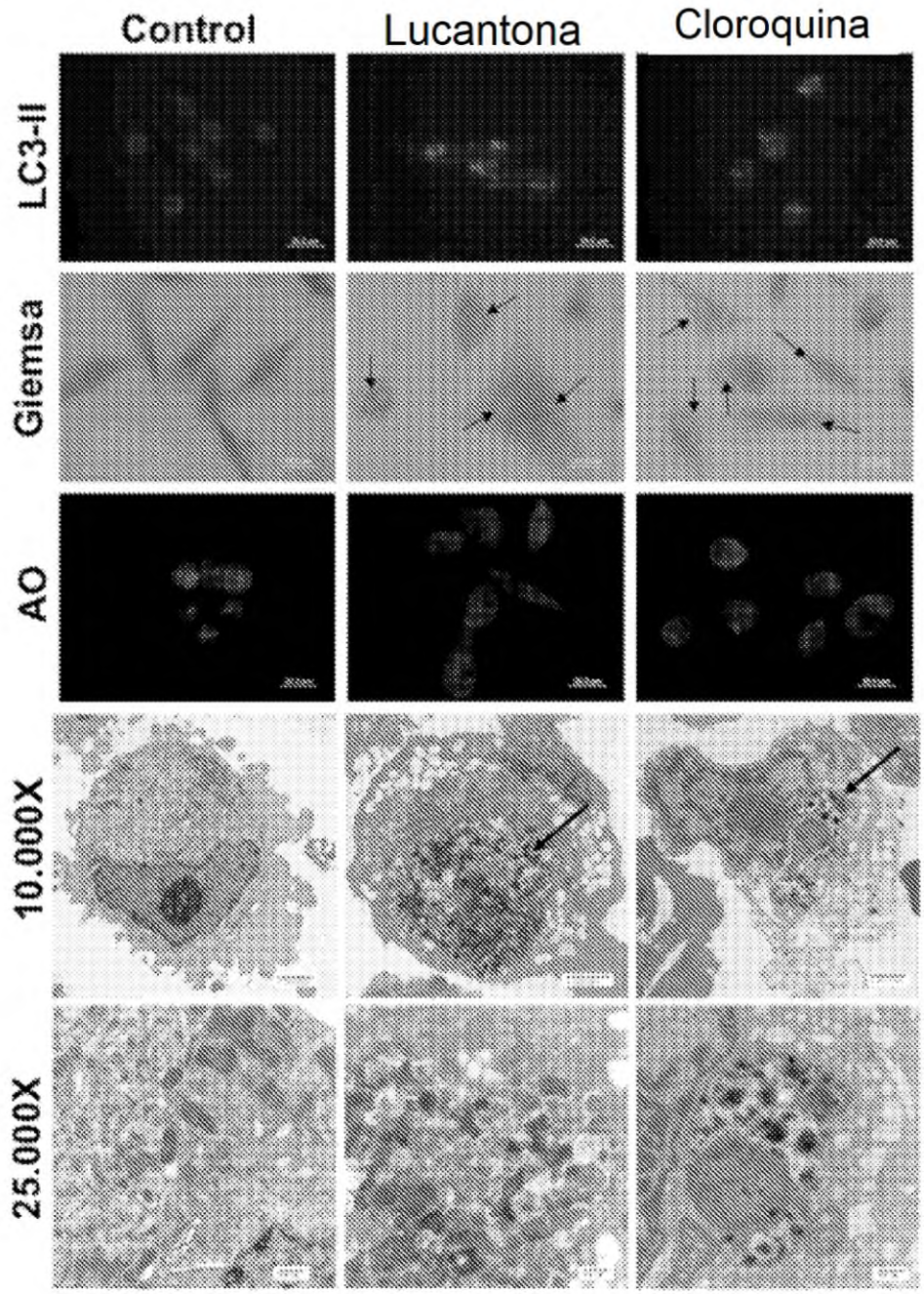

Control
Lucantona
Cloroquina
LC3-II
Giemsa
AO
10.000X
25.000X

FIG. 1B.

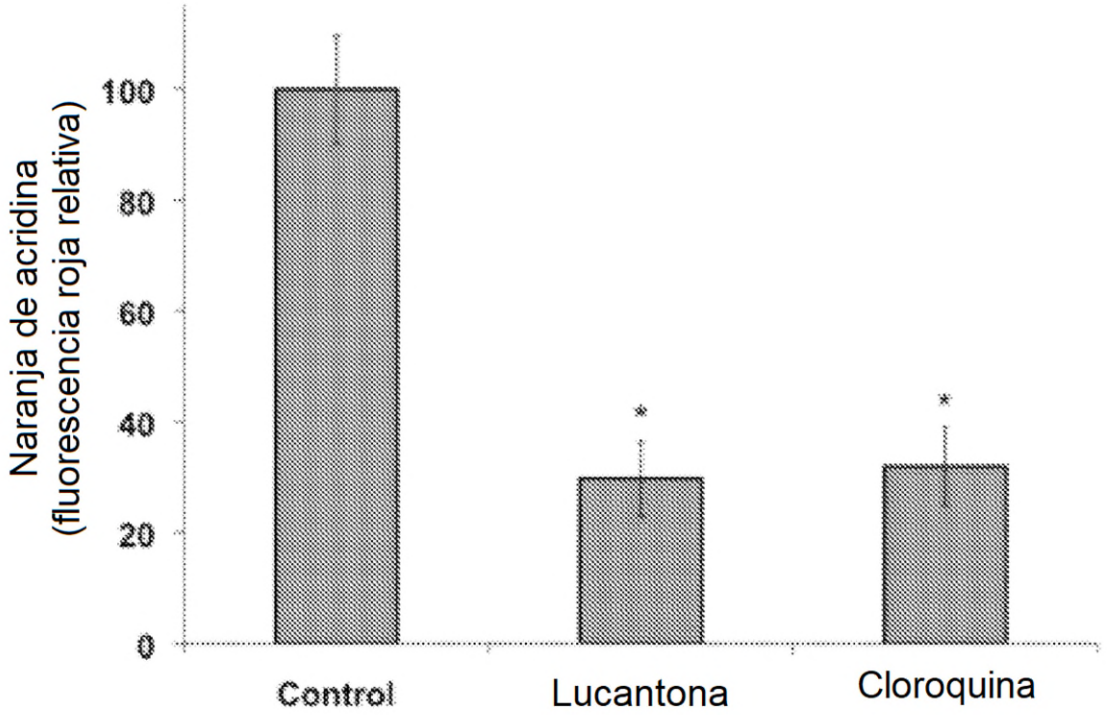

Naranja de acridina
(fluorescencia roja relativa)
100
80
60
40
20
0
*
*
Control
Lucantona
Cloroquina

FIG. 1C.

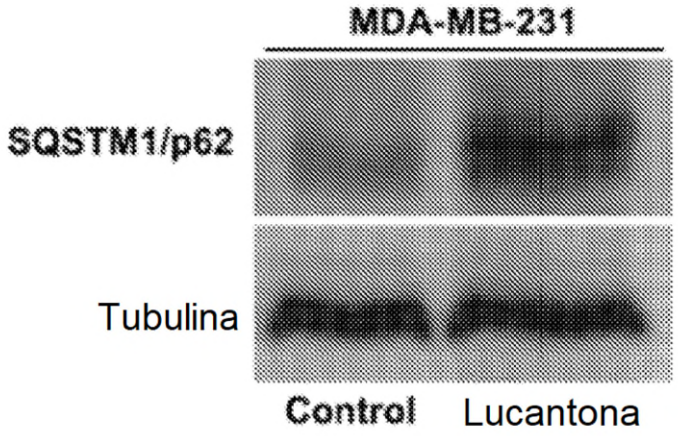

MDA-MB-231
SQSTM1/p62
Tubulina
Control
Lucantona

FIG. 1D.

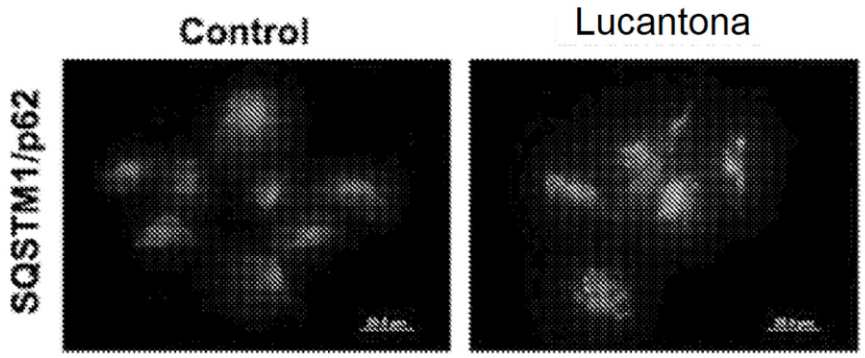

Control
Lucantona
SQSTM1/p62

FIG. 1E.

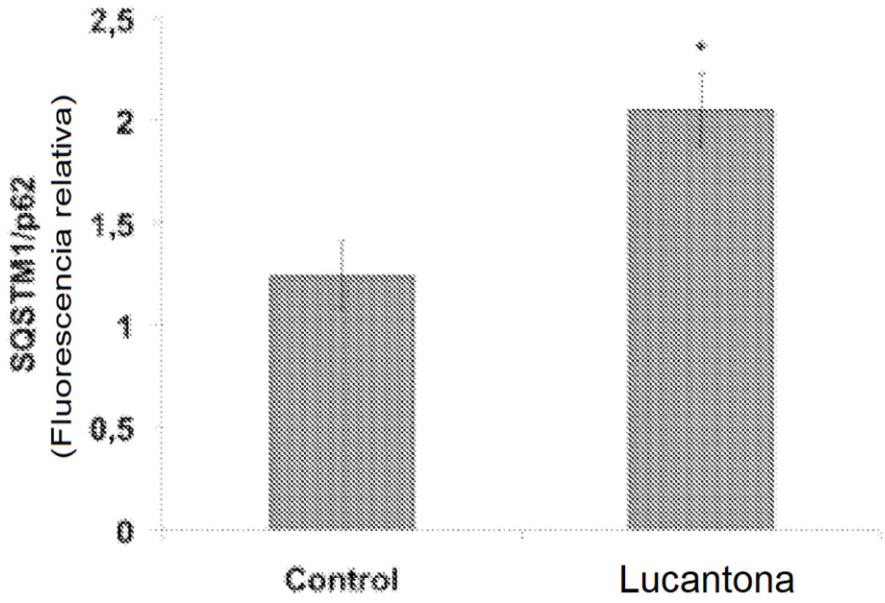

SQSTM1/p62
(Fluorescencia relativa)
2,5
2
1,5
1
0,5
0
*
Control
Lucantona

FIG. 1F.

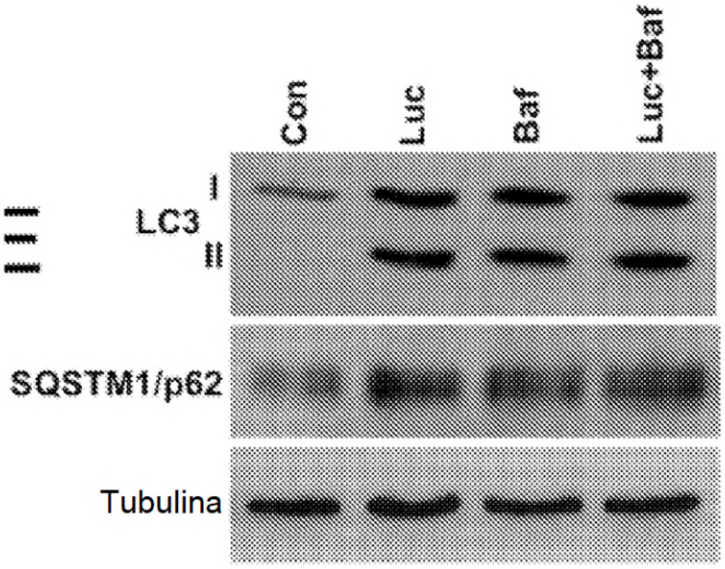

Con
Luc
Baf
Luc+Baf
LC3
I
II
SQSTM1/p62
Tubulina

FIG. 1G.

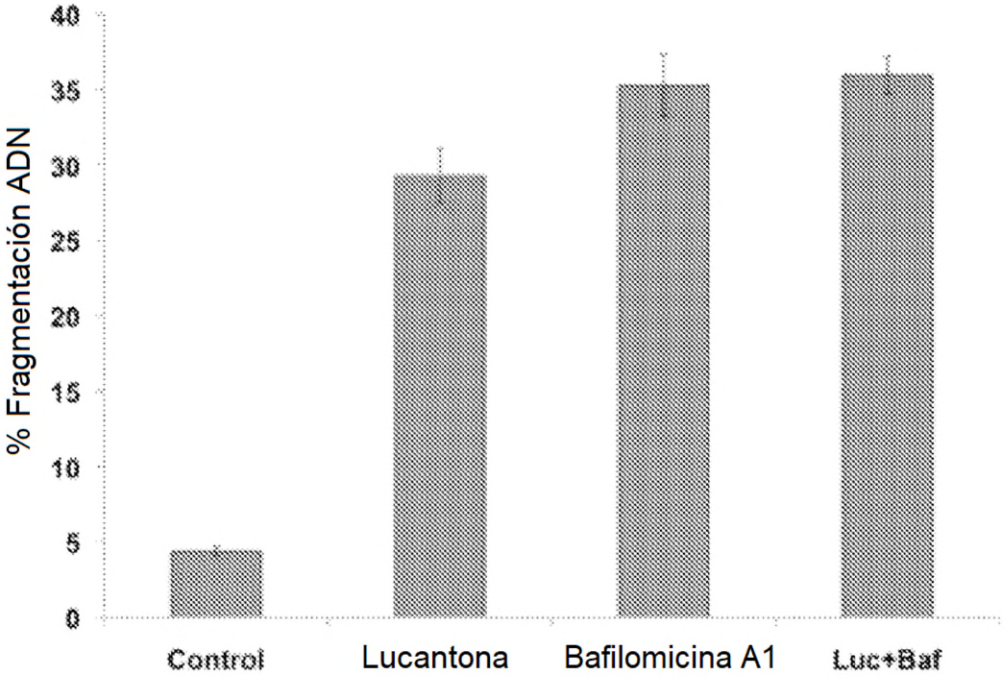

% Fragmentación ADN
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Control
Lucantona
Bafilomicina A1
Luc+Baf

FIG. 2A.

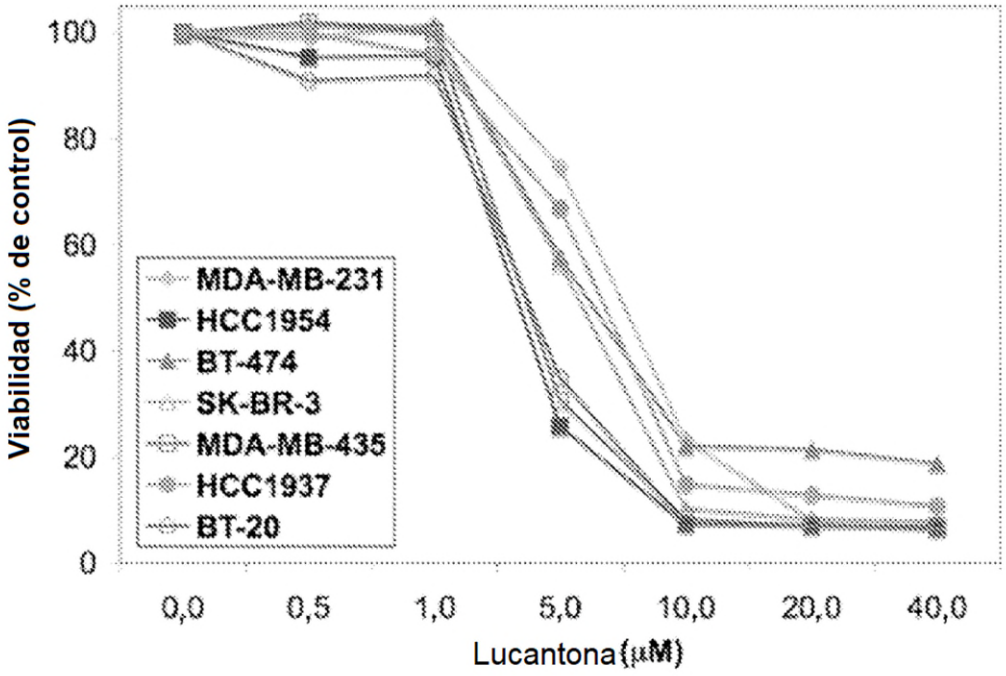

Viabilidad (% de control)
100
80
60
40
20
0
MDA-MB-231
HCC1954
BT-474
SK-BR-3
MDA-MB-435
HCC1937
BT-20
0,0
0,5
1,0
5,0
10,0
20,0
40,0
Lucantona (μM)

FIG. 2B.

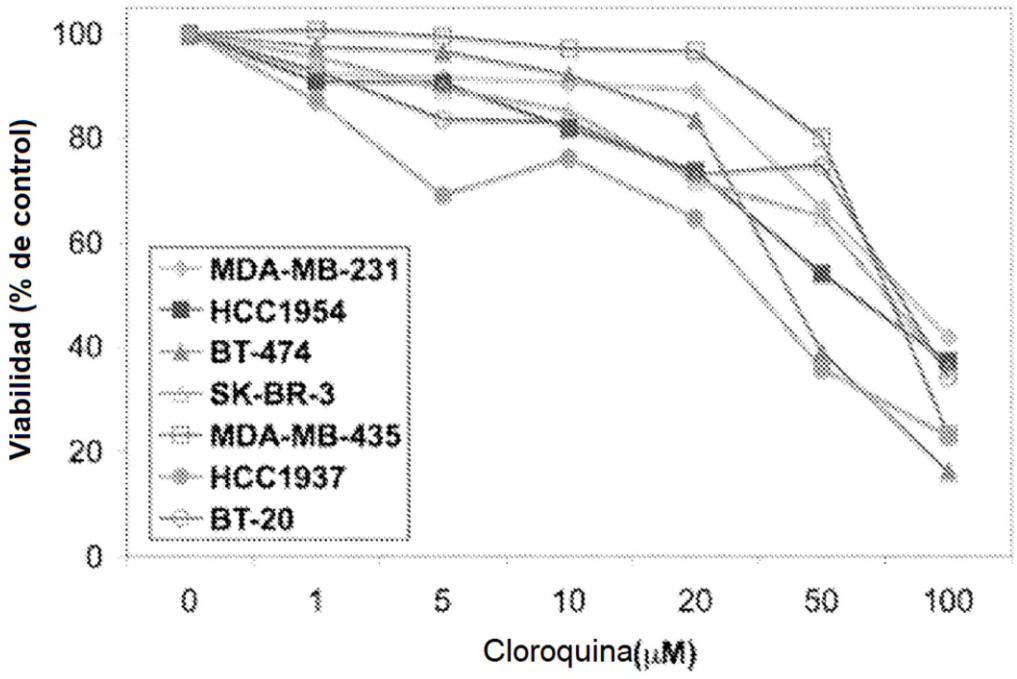

Viabilidad (% de control)
100
80
60
40
20
0
MDA-MB-231
HCC1954
BT-474
SK-BR-3
MDA-MB-435
HCC1937
BT-20
0
1
5
10
20
50
100
Cloroquina(μM)

FIG. 3A.

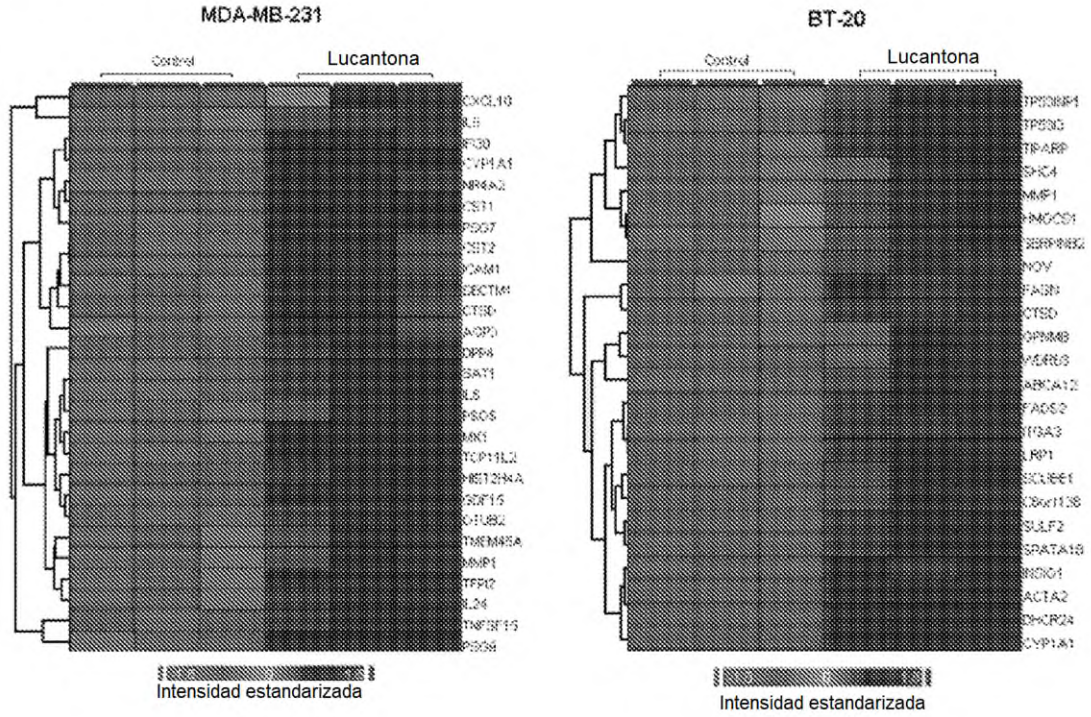

MDA-MB-231
Control
Lucantona
Intensidad estandarizada
BT-20
Control
Lucantona
Intensidad estandarizada

FIG. 3B.

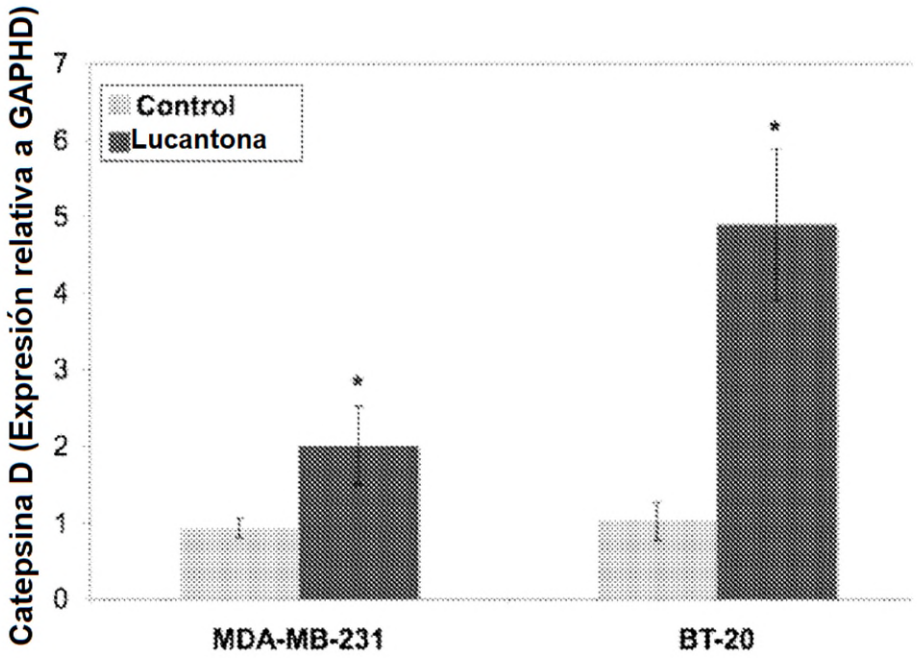

Catepsina D (Expresión relativa a GAPHD)
0
1
2
3
4
5
6
7
Control
Lucantona
*
*
MDA-MB-231
BT-20

FIG. 3C.

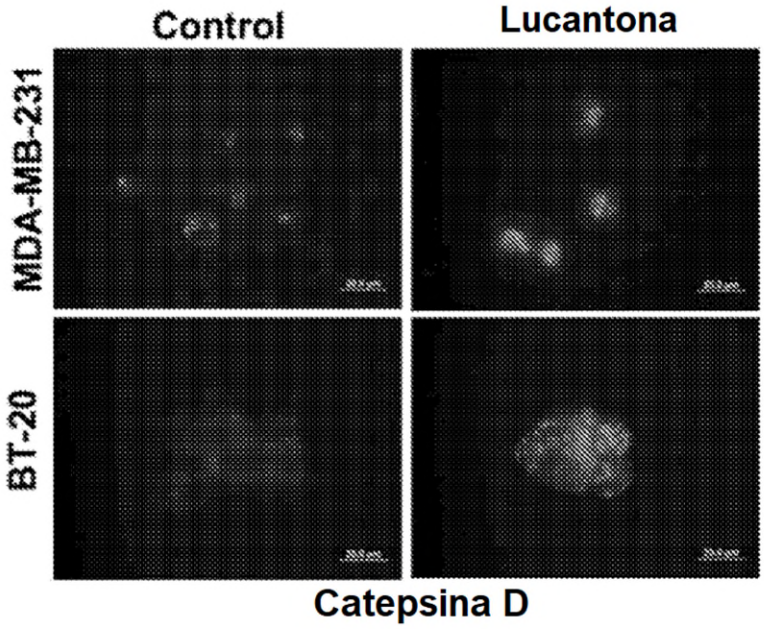

Control
Lucantona
MDA-MB-231
BT-20
Catepsina D

FIG. 4A.

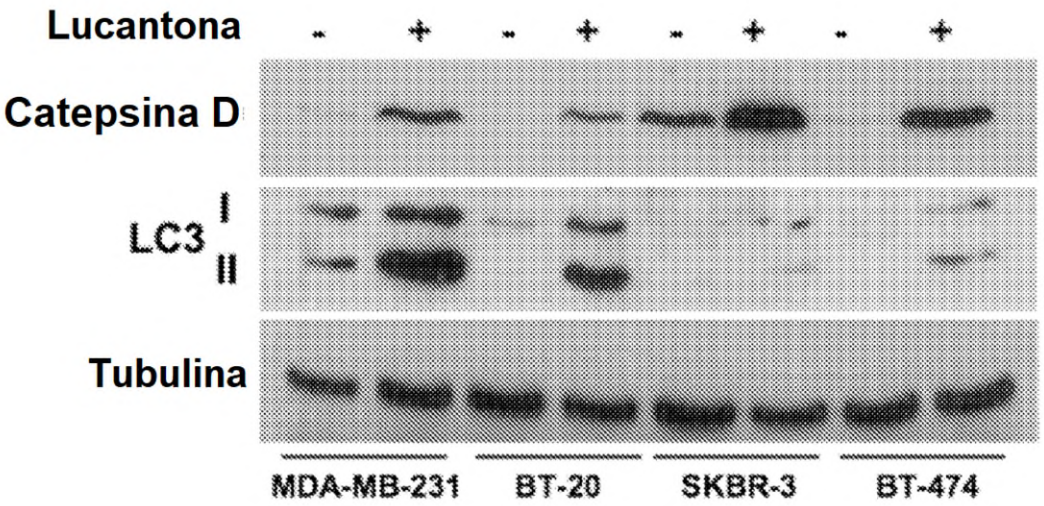

Lucantona
- + - + - + - +
Catepsina D
LC3 I
II
Tubulina
MDA-MB-231
BT-20
SKBR-3
BT-474

FIG. 4B.

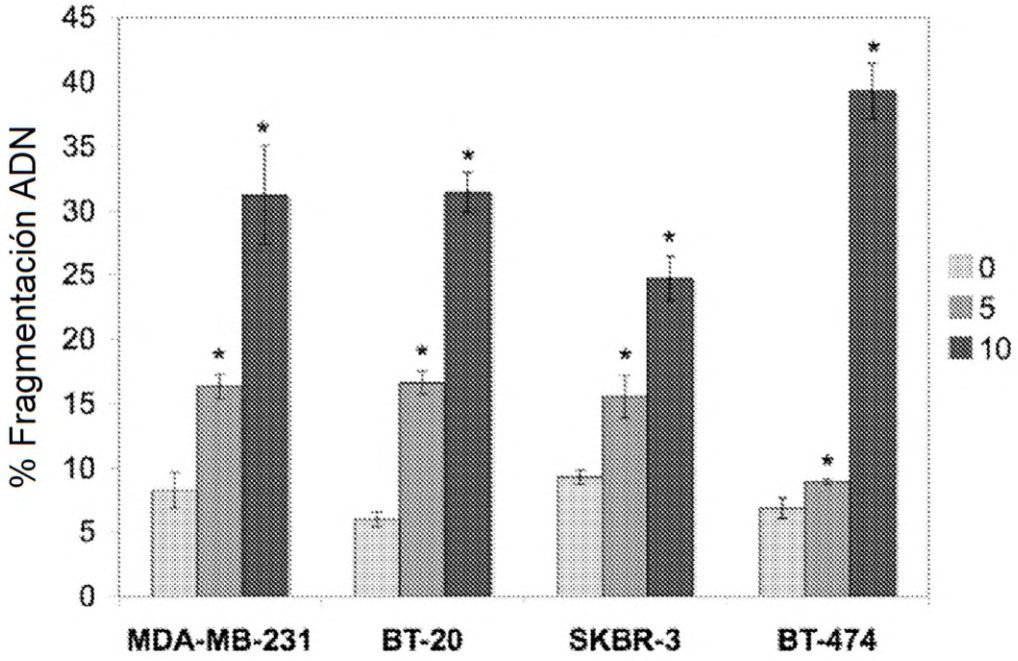

% Fragmentación ADN
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
MDA-MB-231
BT-20
SKBR-3
BT-474
0
5
10

FIG. 4C.

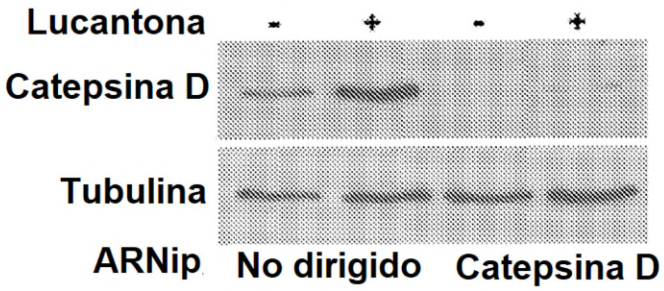

Lucantona
-
+
-
+
Catepsina D
Tubulina
ARNip
No dirigido
Catepsina D

FIG. 4D.

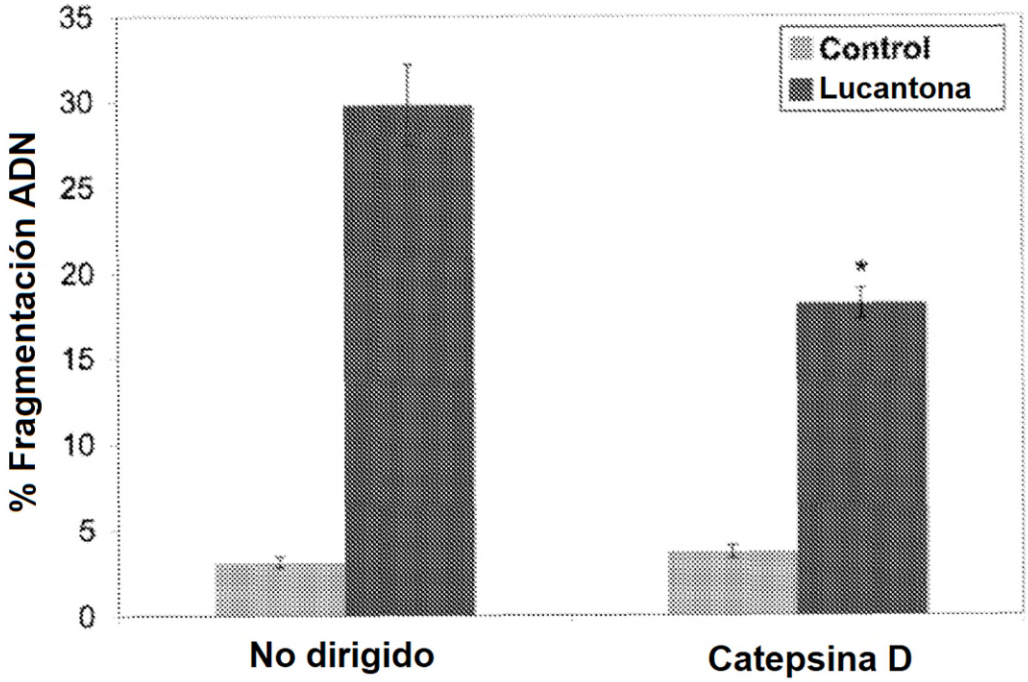

% Fragmentación ADN
35
30
25
20
15
10
5
0
Control
Lucantona
*
No dirigido
Catepsina D

FIG. 5A.

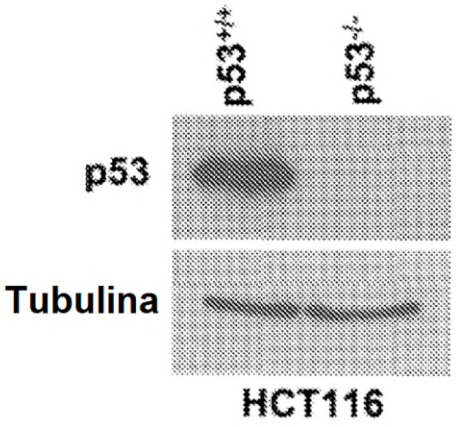

p53+/+
p53-/-
p53
Tubulina
HCT116

FIG. 5B.

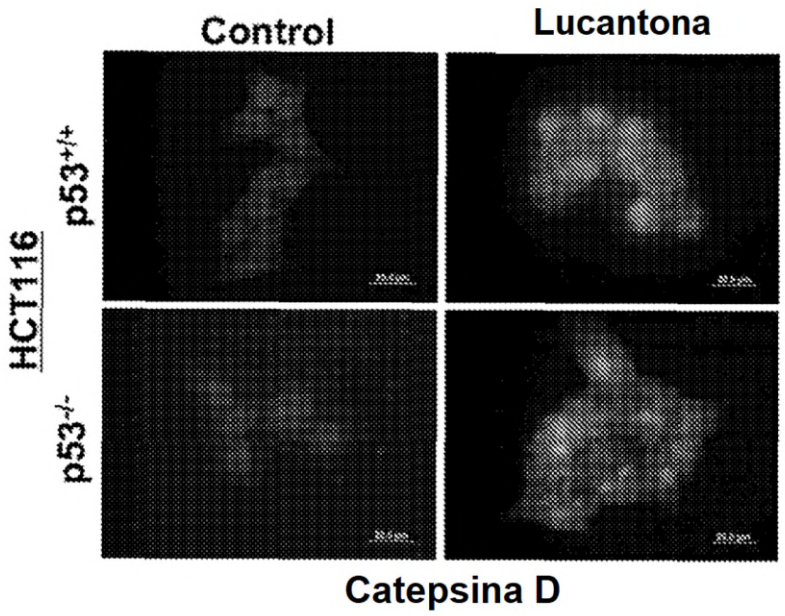

Control
Lucantona
HCT116
p53+/+
p53-/-
Catepsina D

FIG. 5C.

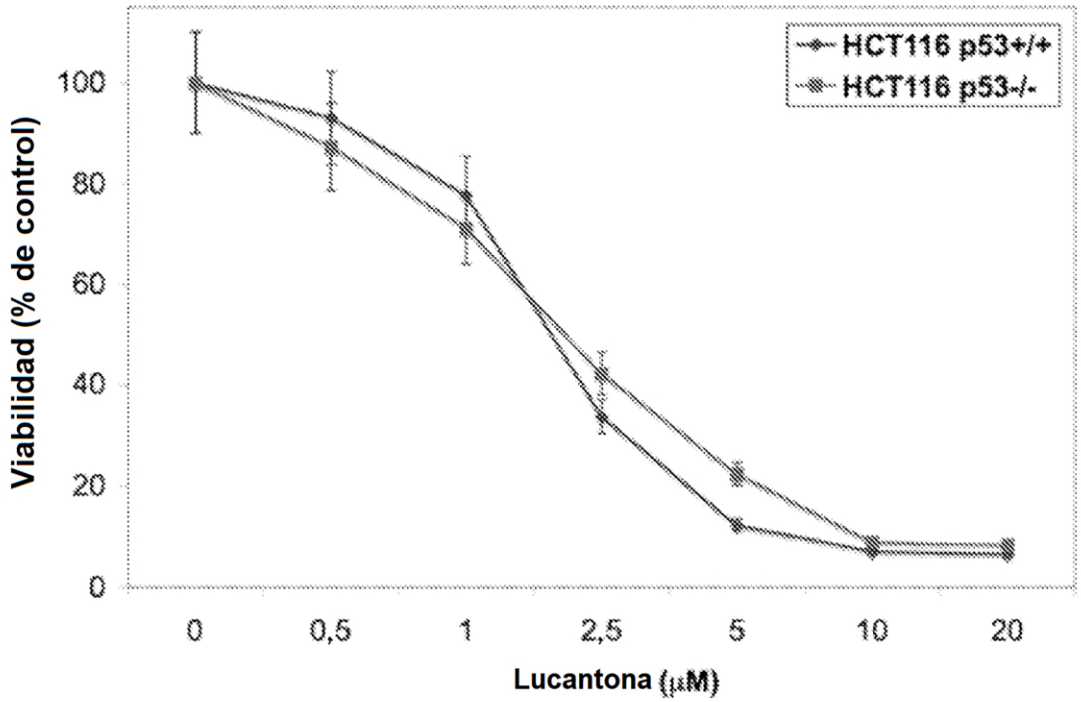

HCT116 p53+/+
HCT116 p53-/-
Viabilidad (% de control)
100
80
60
40
20
0
0
0,5
1
2,5
5
10
20
Lucantona (μM)

FIG. 6A.

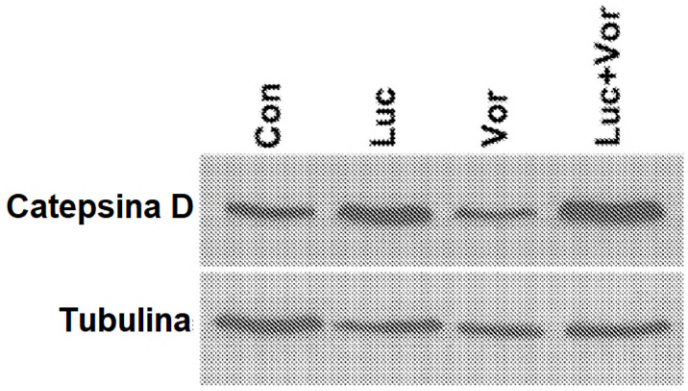

Con
Luc
Vor
Luc+Vor
Catepsina D
Tubulina

FIG. 6B.

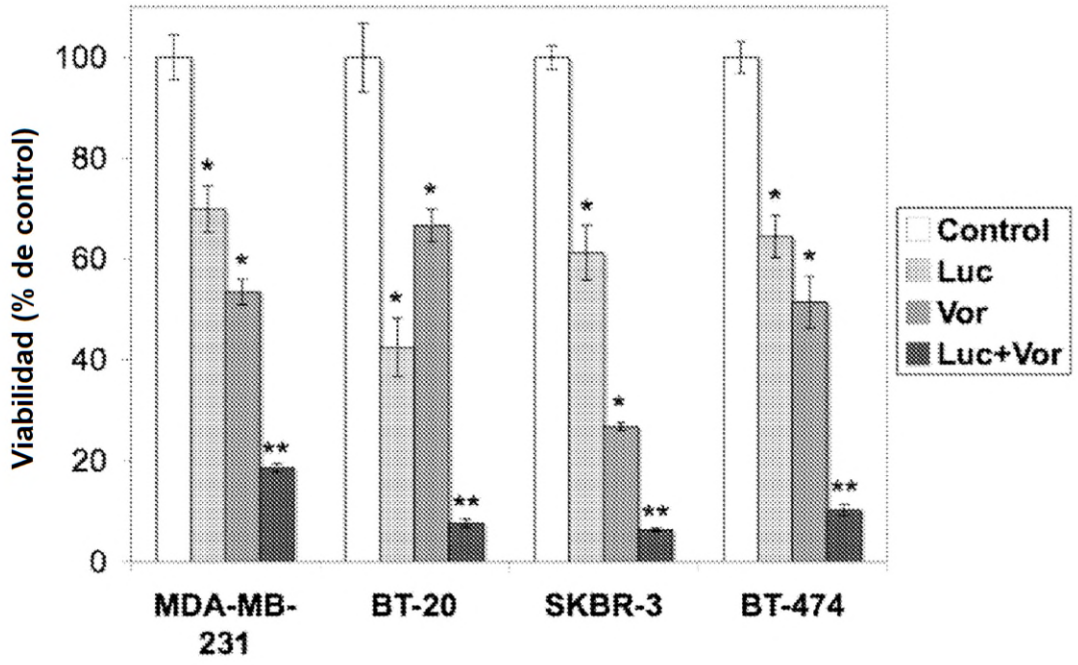

Viabilidad (% de control)
100
80
60
40
20
0
MDA-MB-231
BT-20
SKBR-3
BT-474
Control
Luc
Vor
Luc+Vor

FIG. 6C.

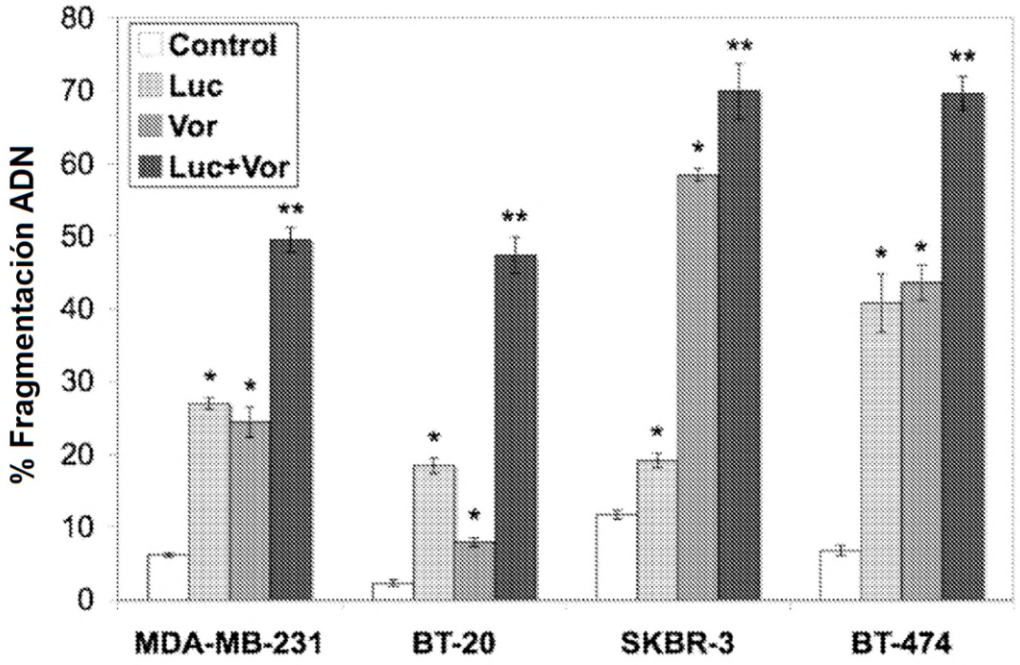

% Fragmentación ADN
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
Luc
Vor
Luc+Vor
*
**
MDA-MB-231
BT-20
SKBR-3
BT-474

FIG. 7A.

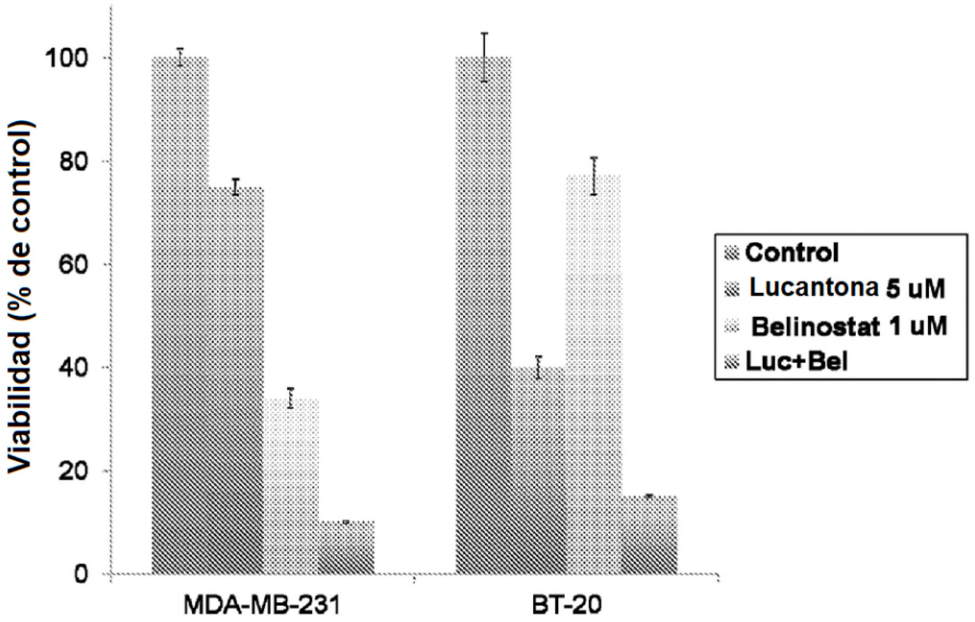

Viabilidad (% de control)
100
80
60
40
20
0
MDA-MB-231
BT-20
Control
Lucantona 5 uM
Belinostat 1 uM
Luc+Bel

FIG. 7B.

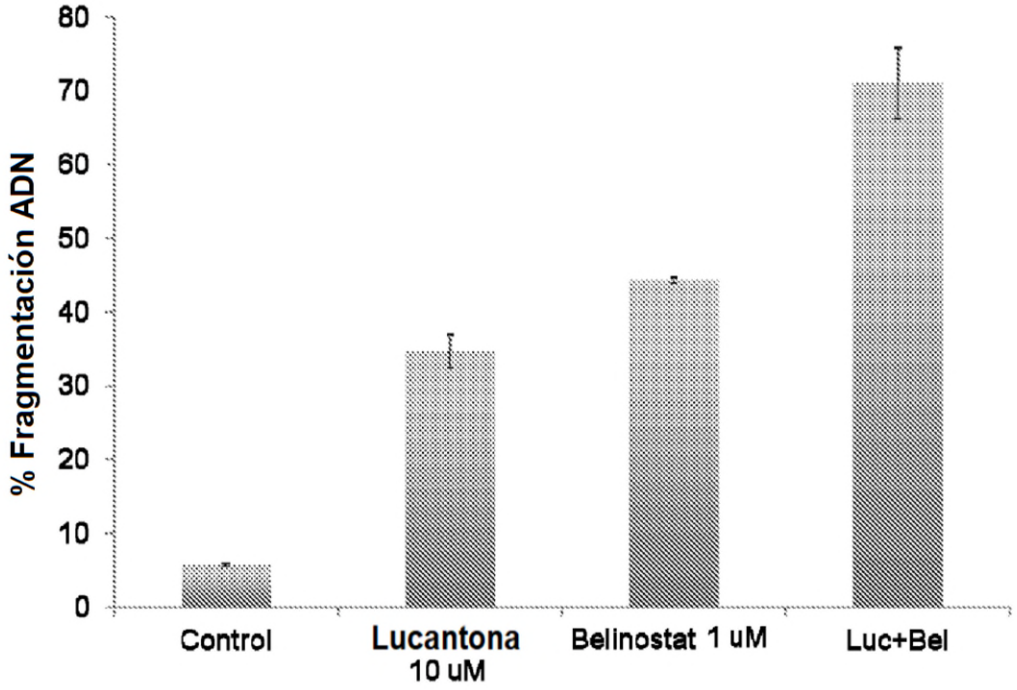

% Fragmentación ADN
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
Lucantona
10 uM
Belinostat 1 uM
Luc+Bel

FIG. 7C.

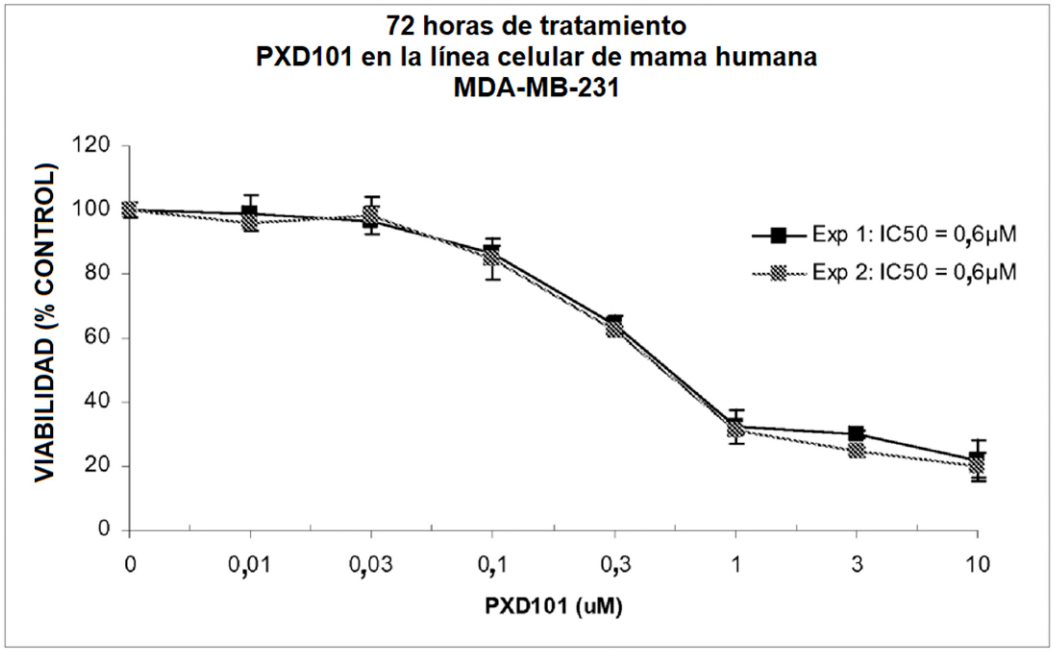
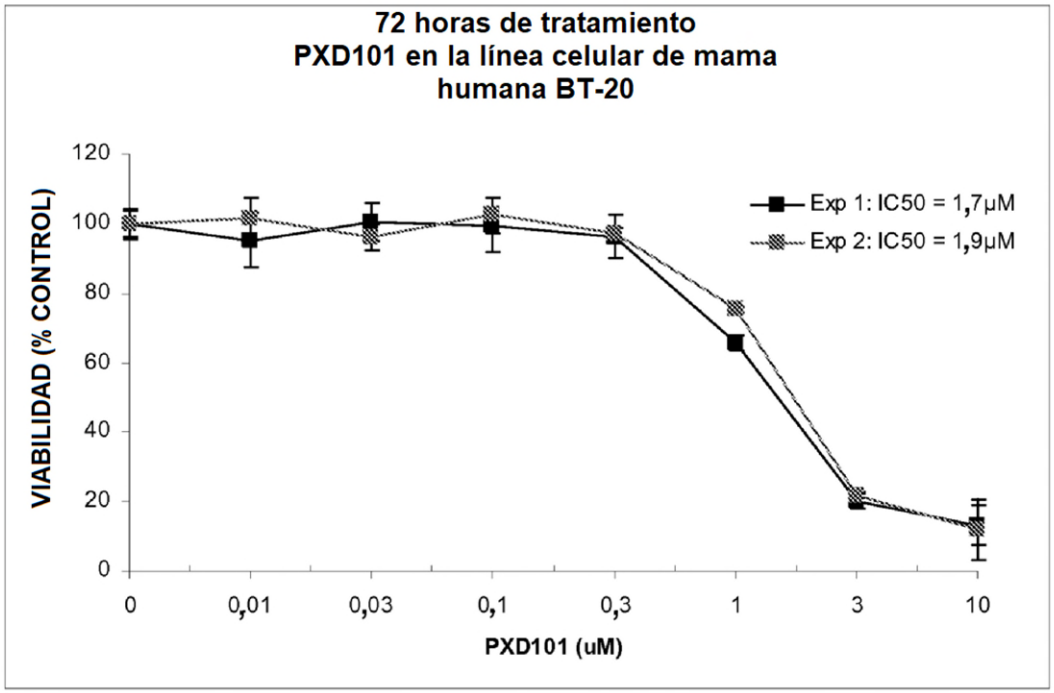

72 horas de tratamiento
PXD101 en la línea celular de mama humana
MDA-MB-231
VIABILIDAD (% CONTROL)
120
100
80
60
40
20
0
0
0,01
0,03
0,1
0,3
1
3
10
PXD101 (uM)
Exp 1: IC50 = 0,6µM
Exp 2: IC50 = 0,6µM

FIG. 7D.


72 horas de tratamiento
PXD101 en la línea celular de mama
humana BT-20
VIABILIDAD (% CONTROL)
120
100
80
60
40
20
0
0
0,01
0,03
0,1
0,3
1
3
10
PXD101 (uM)
Exp 1: IC50 = 1,7µM
Exp 2: IC50 = 1,9µM