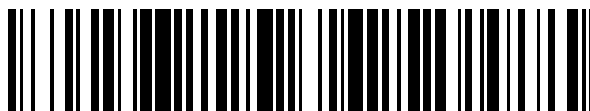


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 684**

51 Int. Cl.:

<b>A01N 43/36</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/427</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/40</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/425</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/475</b>	(2006.01)
<b>C07D 417/06</b>	(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2010 PCT/US2010/052729**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11053466**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2010 E 10827321 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 2496081**

54 Título: **ITE para la intervención y erradicación del cáncer**

30 Prioridad:

**02.11.2009 US 257422 P**

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

**05.11.2020**

73 Titular/es:

**ARIAGEN, INC. (100.0%)  
3000 Sand Hill Road, Building 2, Suite 110  
Menlo Park, CA 94025, US**

72 Inventor/es:

**SONG, JIASHENG**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 791 684 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

ITE para la intervención y erradicación del cáncer

## 5 Campo técnico

Terapia para el Cáncer; Tratamiento para el cáncer; Intervención contra el cáncer; Erradicación del cáncer; Biología del cáncer; Oncología; Terapéutica; Productos farmacéuticos; Productos biofarmacéuticos.

## 10 Antecedentes

El receptor de aril hidrocarburo (Ah) (AhR) es un factor de transcripción inducible por ligando, un miembro de la llamada superfamilia hélice-bucle-hélice básico/Per-Arnt-Sim (bHLH/PAS). Al unirse a su ligando, el AhR media o interactúa con una serie de procesos biológicos, así como también con algunos efectos adversos que incluyen la división celular, la apoptosis (muerte celular programada), la diferenciación celular, las acciones de estrógenos y andrógenos, la diferenciación adiposa, las acciones del hipotálamo, la angiogénesis, la estimulación o supresión del sistema inmunitario, la teratogenicidad, la tumorigenicidad, la iniciación tumoral, la difusión tumoral, la progresión tumoral, la cloracné, el síndrome de desgaste, y las acciones de otros sistemas hormonales además de la expresión de genes de la familia P450 y otros<sup>[1,2,3,4,5,6,7,8]</sup>. El receptor unido al ligando participa en procesos biológicos a través de la translocación del citoplasma al núcleo, la heterodimerización con otro factor llamado translocador nuclear del receptor de Ah, la unión del heterodímero a la región reguladora denominada elemento de respuesta de Ah de los genes bajo la regulación del AhR, y luego la mejora o inhibición de la transcripción de aquellos genes.

El AhR es capaz de unirse, con diferentes afinidades, a varios grupos de sustancias químicas exógenas (por lo tanto, ligandos artificiales) como los hidrocarburos aromáticos policíclicos ejemplificados por el 3-metilcorantreno (3-MC) y los hidrocarburos aromáticos halogenados tipificados por el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD). El sistema del receptor ha sido estudiado hasta ahora con sus ligandos artificiales. Si bien los estudios con aquellos ligandos artificiales del AhR ayudaron a avanzar en nuestra comprensión hacia el sistema del receptor, la aclaración exhaustiva de los roles fisiológicos que desempeña el sistema y los posibles beneficios terapéuticos que puede ofrecer el sistema son imposibles sin la identificación del ligando fisiológico del AhR. Como primera etapa hacia este objetivo, se ha identificado un ligando endógeno para el receptor. El ligando endógeno, o el ligando fisiológico, o la hormona natural, para el AhR se identificó como el éster metílico del ácido 2-(1'*H*-indol-3'-carbonil)-tiazol-4-carboxílico (abreviatura de ITE)<sup>[9,10]</sup>.

Aunque la mayoría de los ligandos artificiales para el AhR son las toxinas ambientales<sup>[1,2,3]</sup> y, por lo tanto, no pueden usarse como agentes terapéuticos, con el propósito de comprender las funciones del AhR unido al ligando, sus ligandos artificiales tales como el TCDD, el 6-metil-1,3,8-triclorodibenzofurano (6-MCDF), el 8-metil-1,3,6-triclorodibenzofurano (8-MCDF) y aquellos derivados del indol o del triptófano, se usaron para revelar que el AhR unido al ligando fue capaz de inhibir la metástasis de los tumores de próstata en una cepa de ratones transgénicos<sup>[11]</sup> y el crecimiento de tumores mamarios de rata inducidos por carcinógeno<sup>[12,13,14]</sup>, los xenoinjertos de células tumorales de mama humana<sup>[15,16]</sup> y los tumores causados por mutaciones genéticas<sup>[17]</sup>.

Como un ligando natural para el AhR, el ITE es un excelente agente para dirigirse de manera precisa y específica al receptor. Sin embargo, la consecuencia de dirigirse es impredecible de lo que hemos aprendido hasta ahora de los comportamientos de aquellos ligandos artificiales para el AhR, con algunos resultados que muestran potenciales anticáncer<sup>[12,13,14,15,16]</sup> mientras que otros muestran iniciación, difusión y progresión tumoral<sup>[8,18,19,20,21]</sup>. Por el hecho de que es antiangiogénico, el ITE podría ser útil en la terapia contra el cáncer<sup>[7]</sup>. Sin embargo, la propiedad de la antiangiogénesis sola no calificará automáticamente al ITE como un agente anticancerígeno efectivo. Hay innumerables ejemplos que prueban el punto<sup>[22,23,24,25]</sup>. Muchos agentes antiangiogénicos fracasaron como agentes terapéuticos<sup>[22]</sup> y muchos otros incluso aceleraron la invasión tumoral y la metástasis<sup>[26,27]</sup> probablemente debido al estrés producido por los agentes: suministro limitado de oxígeno y nutrientes a los tumores. La terapia antiangiogénica es actualmente una preocupación, ya que incluso puede reducir la supervivencia general, el estándar de oro para la terapia contra el cáncer, debido posiblemente a una metástasis acelerada<sup>[23]</sup>. De la propiedad anticancerígena del AhR unido al ligando, revelada por sus ligandos artificiales<sup>[12,13,14,15,16]</sup>, no hay garantía de que el ITE, una vez unido al mismo receptor, también pueda hacer incluso parcialmente lo que podrían hacer estos ligandos artificiales sin mencionar el hecho de que la mayoría de aquellos ligandos artificiales o sus metabolitos pueden ser altamente tóxicos para esas células cancerosas que son probadas. En ese sentido, aquellos ligandos artificiales o sus metabolitos pueden simplemente servir como agentes citotóxicos no discriminatorios, que matan a las células cancerosas, ni siquiera los resultados de dirigirse al receptor de Ah.

Además, un factor crítico determina qué hará un receptor unido al ligando, es la estructura tridimensional (3D) final que asume el receptor unido al ligando, ya que es la estructura 3D la que determina con cuántos factores celulares diferentes interactuará el receptor unido al ligando y cómo estas interacciones deberían llevarse a cabo para conducir los procesos de la vida. La estructura 3D final que asume el receptor unido al ligando está, a su vez, formada únicamente por la estructura 3D del ligando para el receptor en un sistema biológico dado. Esa es la base fundamental que explica por qué la estructura 3D de un ligando es tan crucial en la dirección de sus procesos biológicos y farmacológicos mediados por el receptor. Además, los ligandos con diferentes estructuras se metabolizan de manera diferente y sus diferentes metabolitos ciertamente interferirán con los procesos biológicos de manera diferencial. Es obvio, por lo tanto, que los ligandos con

diferentes estructuras 3D podrían ciertamente conducir a consecuencias biológicas completamente diferentes, incluso si pueden unirse al mismo receptor.

5 La validez del punto se puede establecer fácilmente a través del razonamiento teórico anterior y, por supuesto, a través también de la ilustración de los datos de la literatura. Por ejemplo, aunque el TCDD y el 6-formilindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) son ligandos de alta afinidad para el AhR, se encuentra que el TCDD estimula la diferenciación de las células Treg, suprimiendo así el sistema inmunitario, mientras que el FICZ promueve la diferenciación de las células Th17, estimulando entonces el sistema inmune<sup>[28]</sup>. En otro ejemplo, tanto el TCDD como el ITE son ligandos de alta afinidad para el AhR, pero mientras el TCDD indujo paladar hendido, hidronefrosis y atrofia tímica, el ITE no indujo ninguno de estos<sup>[29]</sup>. Más ejemplos se pueden encontrar fácilmente en la literatura <sup>[30,31,32,33,34]</sup>. Por lo tanto, no es obvio en absoluto que el ITE sea un buen agente anticancerígeno de aquellos estudios con ligandos artificiales para que el AhR muestre su propiedad anticancerígena<sup>[12,13,14,15,16]</sup>o incluso el estudio con el ITE para demostrar su propiedad antiangiogénica<sup>[7]</sup>sin un extenso programa de investigación con diferentes modelos y sistemas experimentales para encontrar una respuesta clara.

15 La situación nos llevó a investigar si el ITE o uno de sus análogos estructurales podrían usarse de manera eficaz y segura para tratar o erradicar el cáncer. La presente invención describe completamente un método para usar el ligando endógeno ITE del receptor de Ah recién descubierto o uno de sus análogos estructurales como agente terapéutico en la intervención o erradicación del cáncer.

20 Resumen de la invención

#### Problema Técnico

25 Hay dos problemas serios con las terapias actuales contra el cáncer en el mercado. El primero son los efectos secundarios graves y la toxicidad. El segundo es la eficacia muy limitada. En consecuencia, el cáncer sigue siendo la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos y áreas del mundo.

30 La mayoría de los agentes terapéuticos actuales para el cáncer, en ambas categorías citotóxicas y no citotóxicas, son sustancias químicas extrañas al cuerpo humano. Como resultado, el cuerpo se esfuerza por deshacerse de ellos mediante el uso de cualquier método metabólico disponible. Dado que nuestro cuerpo no tiene una forma natural y segura de metabolizar aquellas sustancias químicas extrañas, algunas reacciones de oxidación inespecíficas se usan como medios principales del metabolismo. La consecuencia es que los procesos de eliminación inevitablemente generan muchos intermediarios o radicales químicamente activos, que atacarán también las sustancias celulares normales, incluidas, que no se limitan a las del sistema inmune en el cuerpo, lo que provocará efectos secundarios graves, toxicidad y debilitamiento del sistema inmunitario. Dado que la mayoría de estos agentes fueron diseñados por humanos, no por la naturaleza, tienen muchas posibilidades de unirse e interactuar con otros factores celulares (que incluyen, pero que no se limitan a receptores, enzimas y otras proteínas) que sus objetivos esperados en el cuerpo. Estas uniones e interacciones "fuera del objetivo" representan oportunidades significativas para los efectos secundarios.

40 La efectividad de los agentes citotóxicos para la terapia contra el cáncer está limitada principalmente por su toxicidad indiscriminada para las células y tejidos normales, que incluye, pero que no se limita a las del sistema inmunitario. El sistema inmunitario debilitado, como se esperaba, hace que sea imposible lanzar un ataque organizado contra las células cancerosas. La eficacia de los agentes no citotóxicos, que se dirigen a funciones específicas importantes para la supervivencia de las células cancerosas, está limitada por su estrategia basada en un mecanismo único. Sin embargo, una marca distintiva importante del cáncer, son sus constantes cambios genéticos o mutaciones. Una vez que una célula cancerosa cambia a un estado en el que ya no depende de una función específica a la que se dirige un agente terapéutico para la supervivencia, la eficacia del agente se perderá inmediatamente.

50 Solución al Problema

Por lo tanto, la situación exige la aparición de un nuevo agente terapéutico que pueda atacar los cánceres con múltiples capacidades de combate para una potencia sostenida, ayudar al sistema inmunitario al mismo tiempo a organizar un ataque orquestado contra los cánceres y limpiar las células cancerosas individuales para una posible erradicación del cáncer, y limite la posibilidad de interacción "fuera del objetivo" y se metabolice de manera segura para efectos secundarios bajos. El recién descubierto ligando endógeno ITE del receptor de Ah, o uno de sus análogos estructurales es capaz de satisfacer los estrictos requisitos establecidos.

60 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1.

Efectos ventajosos de la invención

65 La ventaja más importante de la presente invención es la capacidad de ataque múltiple al cáncer del ITE o de uno de sus análogos estructurales para desafiar la consecuencia de los constantes cambios genéticos de las células cancerosas. El ITE ha demostrado inhibir la angiogénesis<sup>[7]</sup>. En la literatura, se demostró que el receptor de Ah (AhR) unido al ligando con sus ligandos artificiales (no con el ITE) (los posibles efectos negativos de aquellos ligandos artificiales se ignoran aquí

por el momento) es capaz de inhibir la división celular<sup>[35,36,37]</sup>, promover la muerte celular programada (apoptosis)<sup>[38,39,40]</sup>, inducir la diferenciación celular<sup>[41,42,43]</sup> y bloquear las acciones del estrógeno<sup>[6,44]</sup> y de los andrógenos<sup>[45,46]</sup>. Recientemente, se ha demostrado que el AhR unido al ligando, con ligandos artificiales (no con el ITE) puede inducir la diferenciación de las células T inmunes<sup>[28,47]</sup>, útil para el sistema inmune en la organización de ataques contra patógenos y cánceres. Si el ITE, o uno de sus análogos estructurales, cuando está unido al AhR, también puede tener una o más de las funciones mencionadas más su propiedad antiangiogénica, las capacidades de ataques múltiples al cáncer pueden hacer que su potencia terapéutica contra el cáncer sea sostenible. La sostenibilidad de la potencia del ITE o uno de sus análogos más su capacidad potencial de estimular el sistema inmunitario no solo mejoraría drásticamente la eficacia de la terapia contra el cáncer, sino que también haría posible la erradicación del cáncer. Los datos presentados en los Dibujos y Ejemplos verifican claramente el análisis teórico anterior.

Una gran ventaja de usar el ITE sobre otros en el mercado es su posibilidad de efectos secundarios bajos además de su eficacia sostenible respaldada por sus múltiples capacidades para atacar el cáncer. Al contrario de aquellas sustancias químicas, incluidos los ligandos artificiales del AhR y los agentes usados en las terapias actuales contra el cáncer, extrañas al cuerpo humano y diseñadas por los humanos, el ITE es una hormona natural diseñada por la naturaleza, por lo que la naturaleza puede haber diseñado e implementado un camino natural y seguro para su metabolismo. Su proceso metabólico, por lo tanto, causará menos o incluso ningún problema al cuerpo. Esto significa que puede tener pocos efectos secundarios causados por su metabolismo. Otra razón importante para un posible efecto secundario bajo es que la unión de la hormona natural a su receptor (AhR) es muy específica y precisa, ya que está diseñada por la naturaleza, no por los humanos. La hormona natural ITE, más que aquellas sustancias químicas diseñadas por los humanos, tendrá pocas posibilidades de unirse e interactuar con otros factores celulares para provocar problemas "fuera del objetivo", oportunidades importantes para los efectos secundarios. Los datos experimentales descritos en los Dibujos y Ejemplos apoyan el punto.

Otro tema importante en la terapia contra el cáncer es que es altamente conveniente para un agente terapéutico que trabaje específicamente en las células cancerosas en lugar de las células normales para mejorar su potencia y reducir los efectos secundarios. Este tipo de especificidad se puede lograr si hay más moléculas diana a las que el agente se una en las células cancerosas que en las células normales. La molécula diana para el ITE y sus análogos es el AhR. En la literatura, se informó que el AhR estaba altamente concentrado en los tejidos de pacientes de cáncer de páncreas, pero estaba muy diluido en todos los tejidos de páncreas normales examinados.<sup>[48]</sup> De manera similar, el AhR concentrado también está documentado con cáncer de próstata<sup>[49,50]</sup> y cáncer gástrico<sup>[51]</sup>. Esto significa que la especificidad terapéutica del ITE y sus análogos estructurales podría lograrse al menos en estos tipos de cánceres informados.

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la inhibición del crecimiento de los xenoinjertos de la línea celular de cáncer humano LNCaP en respuesta a las dosis, rutas y programas de administración del ITE, en donde la figura 1A muestra los grados de inhibición del crecimiento de los xenoinjertos de LNCaP (media + SEM, n = 8) en respuesta a la dosis del ITE de 0 (vehículo, DMSO), 0,1, 1, 10, 20 y 40 mg/kg de peso corporal. (inyección i.p., cada 12 horas durante 28 días continuos), y en donde la figura 1B muestra la respuesta de baja toxicidad de los ratones que llevan xenoinjerto al tratamiento juzgado por sus cambios de peso corporal (media + SEM, n = 8), y en donde la figura 1C muestra los perfiles PK (farmacocinéticos) del ITE administrado (dosis única) i.v., i.p. y p.o. con vehículos usados, niveles de dosificación y AUC (Área bajo la Curva) como se indica, y en donde la figura 1D muestra la inhibición del crecimiento del xenoinjerto en LNCaP por el ITE a diferentes dosis (40 u 80 mg/kg de peso corporal), horarios (una o dos veces al día) y rutas (i.p. o p.o.) de administración según lo especificado.

La figura 2 muestra la eficacia del ITE (diamante) o del ITK (uno de los análogos estructurales de ITE, cuadrado) para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de próstata humana (LNCaP), hígado (HepG2), ovario (OVCAR-3) y mama (MCF- 7) (i.p. una vez al día), en donde la figura 2A muestra la inhibición del crecimiento del xenoinjerto de LNCaP por el ITE o el ITK a 20 mg/kg para ambos, y en donde la figura 2B muestra la inhibición del crecimiento de los xenoinjertos de HepG2 por el ITE o el ITK en 80 mg/kg para ambos, y en donde la figura 2C muestra el ITE o el ITK que inhibe el crecimiento del xenoinjerto de OVCAR-3 a una dosis de 80 mg/kg para ambos, y en donde la figura 2D muestra una inhibición del crecimiento de los xenoinjertos de MCF-7 por el ITE a una dosis de 20 mg/kg.

La figura 3 muestra la inhibición y la erradicación del cáncer por el ITE (i.p. una vez al día) en un modelo murino de cáncer de pulmón de Lewis (LLC) singénico, en donde la figura 3A muestra un crecimiento agresivo de tumores LLC y la inhibición de crecimiento tumoral por el ITE a una dosis de 20 mg/kg, y en donde la figura 3B muestra una mejor inhibición del crecimiento del tumor LLC por el ITE a 80 mg/kg (i.p. una vez al día) para que un programa de tratamiento de 28 días más una semana más de observación posterior a la inyección pueda finalizar, y en donde la figura 3C muestra un ratón (número 33, diamante) del grupo ITE (cuadrado) que inicia su contracción tumoral al comienzo de la fase de tratamiento, que queda libre de tumor en el día 13 en el tratamiento, que mantiene el estado libre de tumor durante el resto de la fase de tratamiento, y aún sin tumor en un mes completo de la fase de observación, y en donde la figura 3D muestra los cambios de peso corporal del ratón número 33 (diamante) junto con el del ITE (cuadrado) y el vehículo del grupo control (círculo).

#### Descripción de las modalidades

5 Todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción son los mismos que aquellos usados habitualmente por un experto en la técnica al que pertenece la presente invención, a menos que se defina específicamente de cualquier otra manera. Se entiende que otros materiales y métodos similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente descripción pueden también usarse en la práctica o las pruebas de la presente invención, pero solo los materiales y métodos preferidos se describen más abajo.

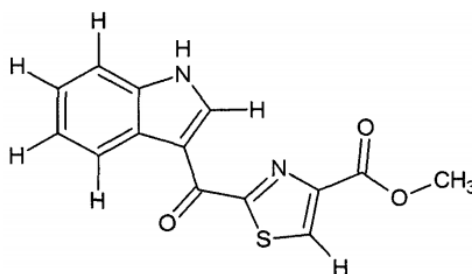
10 La presente invención es un método de intervención o erradicación del cáncer con un ligando endógeno ITE del receptor de aril hidrocarburo (Ah) (AhR) o uno de sus análogos estructurales como se define en la reivindicación 1. El ITE o uno de sus análogos (ingrediente activo) como se define en la reivindicación 1 se pueden formular con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables (sistema portador). El sistema portador consiste en materiales inertes útiles para administrar el ingrediente activo, preferentemente estéril y no tóxico. El sistema portador debe ser compatible con el ingrediente activo y puede estar en forma de sólido, líquido o gas. El ingrediente activo adecuadamente formulado puede administrarse por vía tópica, entérica o parenteral a un sujeto con cáncer. Se puede proporcionar, por ejemplo, en forma de crema, cápsulas, tabletas, pastillas o inyectables. Otros ingredientes compatibles, tales como conservantes, si fuera necesario, podrían formularse conjuntamente con el ingrediente activo.

20 En un programa de intervención preferido, los sujetos con cánceres de próstata, hígado, pulmón, ovario y mama son preferentemente aceptados para el tratamiento con el ITE o uno de sus análogos estructurales como se define en la reivindicación 1. Sin embargo, esto no significa limitar el alcance terapéutico. Dadas las capacidades de ataques múltiples del cáncer que poseen el ITE y uno de sus análogos, más la posibilidad de estimular el sistema inmunitario de un sujeto para atacar el cáncer y limpiar las células cancerosas individuales para una posible erradicación del cáncer, se prevé que el alcance terapéutico se expanda rápidamente en ensayos futuros.

25 En el programa de intervención preferido, el intervalo de dosis efectiva de ITE o de uno de sus análogos estructurales como se define en la reivindicación 1, se determina por la medición de la concentración sanguínea del ITE del sujeto o de uno de sus análogos estructurales bajo un régimen de dosificación específico para establecer un perfil concentración-tiempo, que se consulta con una correlación establecida entre los perfiles similares de concentración-tiempo y los efectos sobre la inhibición o erradicación del cáncer, que se construyeron durante un seguimiento o ensayos como el ilustrado en los Ejemplos, y equilibrando los efectos terapéuticos alcanzables con la posible toxicidad para el sujeto y la condición de salud o durabilidad física del sujeto. La frecuencia de dosificación de ITE o de uno de sus análogos estructurales se decide de manera similar a como se describió para la determinación del intervalo de dosis anterior. Actualmente, se propone una administración diaria, ya sea entérica o parenteral, como preferible con el ITE. La dosificación continuará hasta que el sujeto esté libre del cáncer. Es preferible para proporcionar un mantenimiento de la dosificación, cuya duración se dirige por un ensayo o ensayos, después de que el sujeto esté libre de cáncer para asegurar su completa eliminación o erradicación.

40 En otro programa de intervención preferido, el ITE o uno de sus análogos estructurales como se define en la reivindicación 1 se pueden administrar en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos contra el cáncer, preferentemente que apuntan a diferentes dianas terapéuticas distintas del AhR. El ITE o uno de sus análogos estructurales pueden formularse independientemente de o junto con uno o más de los otros agentes mencionados. El ITE o uno de sus análogos estructurales pueden administrarse en el mismo horario con o diferente de uno o más de los otros agentes mencionados. La proporción del ITE o de uno de sus análogos estructurales a uno o más de los otros agentes terapéuticos contra el cáncer será dirigida por un ensayo o ensayos bien diseñados. La combinación de la terapia del ITE o de uno de sus análogos con uno o más de los otros agentes terapéuticos contra el cáncer puede mejorar aún más la eficacia. Hay muchos ejemplos para mostrar los beneficios de la terapia combinada.

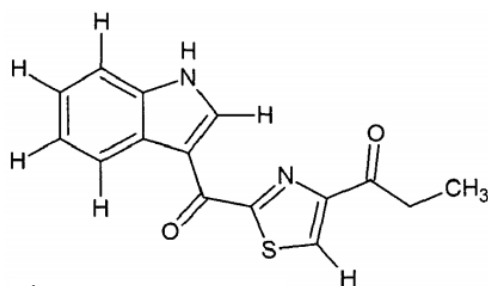
50 En aquellos programas de intervención preferidos, el ingrediente activo es el ligando endógeno ITE del receptor aril hidrocarburo (Ah) (AhR) con la siguiente fórmula estructural (Fórmula Estructural 1):



Fórmula Estructural 1

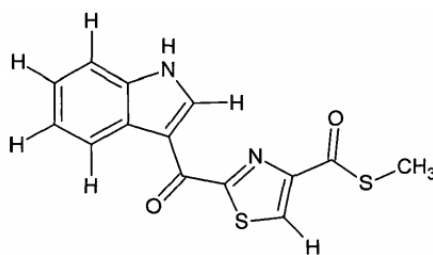
60 En aquellos programas de intervención preferidos, el ingrediente activo se puede seleccionar entre dos análogos estructurales especialmente útiles del ITE. Se prevé que dichos dos análogos aumenten su estabilidad y luego extiendan su vida media en los sistemas de los sujetos, ya que un grupo funcional de la cetona o del tiol éster reemplaza al éster normal (oxígeno), al que se dirige fácilmente por numerosas esterasas en sistemas biológicos, en la estructura del ITE. La vida media prolongada puede traducirse en una mayor eficacia y/o mayor duración de la potencia en la intervención

contra el cáncer. El análogo de la cetona (por consiguiente, denominado ITK) del ITE tiene la siguiente fórmula estructural (Fórmula Estructural 2):



Fórmula Estructural 2

Mientras que la fórmula estructural del análogo del tior éster (S, azufre) (por consiguiente, denominado ITSE) del ITE es la siguiente (Fórmula Estructural 3):



Fórmula Estructural 3

## EJEMPLOS

Los ejemplos de estudios preclínicos en animales ayudarán adicionalmente a las modalidades de la presente invención. Será demostrado el uso del ITE en la inhibición del crecimiento del cáncer de próstata humano (Ejemplo 1), el uso del ITE o el ITK (uno de los análogos del ITE) para inhibir el crecimiento de más tipos de cáncer humano (Ejemplo 2), el uso del ITE en la posible erradicación del cáncer (Ejemplo 3), y el monitoreo de la toxicidad del ITE (Ejemplo 4).

### Ejemplo 1

#### Materiales

Ratones BALB/c machos desnudos (*Mus musculus*), de 6 a 8 semanas de edad, se marcaron individualmente por codificación en la oreja. Los animales se mantuvieron en salas de flujo laminar a una temperatura constante de 20 a 26 °C y una humedad de 40 a 70 % con 1 animal en cada jaula de policarbonato (300 mm x 180 mm x 150 mm). El material de la cama era mazorca de maíz, que se cambiaba dos veces por semana. Los animales tuvieron libre acceso a comida granulada seca estéril y agua potable estéril durante todo el estudio.

El ITE se sintetizó por los Laboratorios KNC Co., Ltd. (Tokio, Japón). El número de lote del compuesto es 086-009-2-1 (como núm. de lote: AHR-001 para AhR Pharmaceuticals). El DMSO (Cat. núm.: 0231-500ML) se fabricó por AMRESCO (Solon, OH, EE.UU.). El Labrasol se compró de Gattefosse (Saint-Priest, Francia) y el PEG 400 se suministró por Sigma (St. Louise, MO, EE.UU.).

#### Métodos

##### Estudios de eficacia.

Todos los procedimientos relacionados con el manejo, cuidado y tratamiento animal en el estudio se realizaron siguiendo las pautas aprobadas por un Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) de Crown Bioscience, Inc. (Santa Clara, CA, EE.UU., una organización de investigación por contrato que contratamos) con base en la guía de la Asociación para la Evaluación y Acreditación de Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC). Los animales se controlaron para cualquier efecto del crecimiento del tumor y el tratamiento farmacológico en el comportamiento normal, tal como la movilidad, el consumo de alimentos y agua, la ganancia/pérdida de peso corporal (el peso corporal bruto se midió dos veces por semana), el efecto mate del ojo/cabello y cualquier otro efecto anormal. La muerte y los signos clínicos observados se registraron en función del número de animales dentro de cada grupo. A los animales individuales con un volumen tumoral superior a 3000 mm<sup>3</sup> o animales de un grupo con un volumen tumoral medio superior a 2000 mm<sup>3</sup> se les aplicó la eutanasia. Además, los animales que mostraban signos de angustia y/o dolor severos, que bajaban el peso corporal en más del 20 % al comienzo del tratamiento, o que perdían la capacidad adecuada de acceder a alimentos o agua se sacrificaron humanamente.

Se mantuvo la línea celular humana de cáncer de próstata LNCaP (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU.) *in vitro* como cultivo en monocapa en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y L-glutamina 2 mM a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire. Las células tumorales se subcultivaron rutinariamente dos veces por semana. Las células que crecen en una fase exponencial se recolectaron y se contaron para la inoculación del tumor.

Cada ratón se inoculó por vía subcutánea en el flanco derecho con las células LNCaP (1 x 10<sup>7</sup>) en 0,1 ml de PBS para el desarrollo tumoral. Cuando el volumen tumoral medio alcanzó alrededor de 150 mm<sup>3</sup>, los ratones portadores de tumor se dividieron en bloques homogéneos en función de sus volúmenes tumorales seguidos de una aleatorización de ratones en cada bloque en grupos de tratamiento (minimizando así las variaciones en la respuesta tumoral a los tratamientos debido a la diferencia en los volúmenes tumorales medios iniciales). Cada grupo de tratamiento consistió en 8 ratones portadores de tumor. El vehículo (DMSO) o el ITE en el vehículo a dosis especificadas se administraron a los ratones por vía i.p. (intraperitoneal) o por inyección p.o. (oral) una o dos veces al día durante 28 días continuos como se indica.

El volumen del tumor se midió dos veces por semana en dos dimensiones mediante el uso de un calibrador y el volumen se calculó con una fórmula de:  $V = 0,5 a \times b^2$ , donde a y b son el diámetro largo y corto (en mm) de un tumor, respectivamente. El volumen tumoral se usó luego para los cálculos de TGI (Inhibición del Crecimiento Tumoral) y de TGD (Retraso del Crecimiento Tumoral). El TGI se determinó por:  $TGI = \Delta T / \Delta C \times 100 \%$ , donde  $\Delta T$  fue la diferencia entre el volumen tumoral medio en un día específico de observación y en el día en que comienza el tratamiento (día 1) para un grupo tratado con el fármaco, mientras que  $\Delta C$  fue la misma diferencia medida para el grupo control. El TGD se calculó como:  $TGD = T - C$ , donde T fue el tiempo (en días) requerido para que los tumores en un grupo tratado con fármaco alcancen un volumen tumoral medio predeterminado y C el tiempo (en días) en el grupo de control para alcanzar el mismo volumen. El peso tumoral se dedujo igualando 1000 mm<sup>3</sup> en volumen a 1000 mg en peso. Luego se dedujo el peso corporal neto restando el peso tumoral del peso corporal bruto correspondiente con el tumor.

Se proporcionan estadísticas resumidas, que incluyen la media y el error estándar de la media (SEM), para el volumen tumoral de cada grupo en cada punto de tiempo. El análisis estadístico de la diferencia en el volumen tumoral entre los grupos se realizó en un conjunto de datos, ya sea en el mejor momento terapéutico o en el día de dosificación final como se indica. Los datos del volumen tumoral se transformaron logarítmicamente y se evaluaron mediante el uso de un ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Tukey cuando se observó significación. Todos los datos se analizaron mediante el uso del SPSS 16.0 y se consideró que  $p < 0,05$  era estadísticamente significativo.

Estudios PK

También se usaron ratones desnudos machos en estudios PK (farmacocinéticos). Para la inyección i.v., se administró el ITE a 1 mg/kg de peso corporal con DMSO como vehículo a través de la vena de la cola. Para i.p. Inyección, se administró el ITE a 10, 40 y 80 mg/kg de peso corporal con DMSO a través del cuadrante abdominal inferior izquierdo. En la inyección p.o., se administraron el ITE a 40 y 80 mg/kg de peso corporal con un vehículo de Labrasol:PEG 400 (2:8, v/v) mediante sonda oral. Cada 15 ratones recibieron una inyección única en cada nivel de dosificación y cada 3 de los ratones dosificados se usaron para recolectar muestras de sangre en cada punto de tiempo (0, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 h). Los animales se rotaron para tomar muestras dos veces cada uno, pero la duración entre los dos tiempos de muestreo fue de al menos 110 minutos. El animal fue anestesiado con isoflurano y sujeto manualmente. Se recolectan aproximadamente 150 µl de sangre total en cada punto de tiempo (mediante punción retroorbital) en un Tubo de EDTA-K<sub>2</sub> Las muestras de sangre se colocaron en hielo y el plasma se procesó (4000 g, 5 min, 4 °C) dentro de los 15 min posteriores al muestreo. Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Se añadió una alícuota de 20 µl de muestra de plasma con 20 µl de un estándar interno (Glipizida, 500 ng/ml en ACN, para la eficiencia de la extracción) a 120 µl de ACN (acetónitrilo). La mezcla se sometió a vórtice a 1500 rpm durante 2 minutos. y luego se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min. Se inyectaron cinco (5) µl del sobrenadante en un sistema LC-MS/MS (API 4000, Foster City, CA, EE.UU.). Se usó una columna Gemini-C18 (2,0 x 50 mm, 5 µm) y la LC (cromatografía líquida) se ejecutó a un régimen de flujo de 0,45 ml/min con el siguiente programa:

Tiempo (min)	0,0	0,2	1,8	2,8	2,9	4,0
Bomba A (%)	95	95	2	2	95	Parada
Bomba B (%)	5,0	5,0	98	98	5,0	Parada

donde la bomba A era para 1 mM de NH<sub>4</sub>OAc (acetato de amonio) en agua más 0,025 % de FA (ácido fórmico) mientras que la Bomba B era para 1 mM de NH<sub>4</sub>OAc en acetónitrilo más 0,025 % de FA. El proceso de ionización negativa de la espectrometría de masas se realizó en un modo APCI (Ionización Química a Presión Atmosférica) mientras que la detección en un modo MRM (Monitoreo de Reacción Múltiple). El ITE se identificó reconociendo un tiempo de retención de LC de 2,5 min y dos picos de masas 285,0 (antes de la colisión) y 142,0 m/z (después de la colisión) mientras que el estándar interno de 2,35 min y dos picos de masas a 444,3 (antes de la colisión) y 319,3 m/z (después de la colisión). El ITE se cuantificó mediante una curva estándar generada cada vez por una serie de cantidades conocidas de ITE que se ejecutan a través del proceso de extracción/precipitación después de mezclar con plasma de ratón y el sistema LC-MS/MS. Se usó el software de estadísticas WinNonlin V5.2 (Pharsight Corporation, California, EE.UU.) para generar parámetros PK como C<sub>máx</sub>, T<sub>máx</sub>, T<sub>1/2y</sub> AUC (Área bajo la Curva), etc., mediante el uso de un modelo no compartimental.

## Resultados y Discusión

Tratamiento con el ITE a dosis de 1, 10, 20 y 40 mg/kg de peso corporal. (i.p., cada 12 horas durante 28 días continuos, DMSO como vehículo, 0,5 ml/kg de peso corporal como volumen de inyección) produjo actividades anticancerígenas significativas con una clara relación dosis-efecto (Figura 1A). Las TGI (inhibición del crecimiento tumoral) se calcularon como 52 %, 31 %, 26 % y 22 % en el día 28 (n = 8; p < 0,048, 0,007, 0,004 y 0,004), respectivamente, para la serie de dosificación. Los TGD (retrasos en el crecimiento tumoral) de 3, 10, 12 y 16 días, respectivamente, con un tamaño tumoral de 600 mm<sup>3</sup> fueron alcanzados por la serie. El ITE a 0,1 mg/kg de peso corporal no produjo una actividad anticancerígena estadísticamente significativa (n = 8, TGI = 74 % en el día 28, p < 0,623). A juzgar por los cambios en el peso corporal de los ratones con tumor, el tratamiento con el ITE no pareció provocar una respuesta tóxica significativa (Figura 1B).

Para comprender el comportamiento farmacocinético (PK) del ITE y dirigir más estudios de eficacia, se administró el ITE a ratones desnudos en diferentes rutas y en diferentes niveles. Los perfiles PK del ITE se representan en la figura 1C. El ITE en DMSO a 1 mg/kg de peso corporal administrado por una inyección i.v. en el bolo se degradó muy rápidamente con una vida media estimada de 6 min. Un AUC estimada para la ruta fue de 256 hr.ng/ml. El ITE en DMSO administrado por inyección i.p. mejoró su vida media mientras que la eficiencia de absorción fue inferior al 10 % en comparación con la de inyección i.v.. Por ejemplo, la vida media del ITE para 10, 40 y 80 mg/kg de peso corporal de inyección i.p. fue de 1,13, 1,61 y 5,17 hr., respectivamente, mientras que el AUC para la serie fue 197, 332, 499 hr.ng/ml, respectivamente. El ITE en Labrasol:PEG 400 (2:8, v/v) administrado por vía p.o. tenía una eficiencia de absorción aún menor (alrededor del 1 %) mientras que mantenía la vida media a los niveles alcanzados por la inyección i.p. El AUC para los niveles de dosificación de 40 y 80 mg/kg de peso corporal de inyección p.o. fue 107 y 97 hr.ng/ml, respectivamente (Figura 1C).

En base a los resultados de los estudios de PK, se exploraron más a fondo el cronograma, el nivel de dosificación y las rutas de administración del ITE. Cuando una dosis diaria total se mantuvo igual, el programa de dosificación de una o dos veces al día para la ruta i.p. resultó en una eficacia comparable en la inhibición del crecimiento del cáncer (por ejemplo, 80 una vez frente a 40 mg/kg de peso corporal dos veces al día, figura 1D). El aumento adicional de la dosis del ITE a 80 mg/kg (dos veces al día, i.p.) pareció mejorar aún más el TGI de 40 mg/kg (dos veces al día, i.p.). Los valores de TGI para 80 mg/kg (dos veces al día, i.p.) fueron los mejores obtenidos hasta ahora, 12 % en el día 28 y 16 % en el último día, por ejemplo. A pesar de que la eficiencia de absorción del ITE por vía p.o. a una dosis de 80 mg/kg fue mucho menor que la de 10 mg/kg i.p. en términos de AUC (Figura 1C), la de 80 mg/kg p.o. al día fue similar a la de 40 mg/kg i.p. al día en términos de inhibición del crecimiento del cáncer (TGI = 46 % en el día 24, por ejemplo) durante las primeras tres semanas más o menos. A partir de los estudios de PK, el nivel plasmático del ITE de 80 mg/kg p.o. fue más bajo que el de 10 mg/kg i.p. en las horas iniciales, pero se volvió más alto que el de 10 mg/kg por vía i.p. e incluso 40 mg/kg por vía i.p. durante la hora 3 a 8 posterior a la inyección (Figura 1C). Esa puede ser la razón detrás de los resultados de la inyección p.o. durante las primeras tres semanas. Para la inyección p.o., su eficacia terapéutica de alguna manera no duraría más que la de las inyecciones i.p. hacia y posterior al final del tratamiento (Figura 1D).

## Ejemplo 2

## 40 Materiales y Métodos

El cultivo y la inoculación de la línea celular humana de cáncer de próstata LNCaP fueron como se describió en el Ejemplo 1. La manipulación de la línea celular de cáncer de hígado humano HepG2 (ATCC) fue similar a la de LNCaP, excepto que se usó medio DMEM (en lugar de RPMI-1640), no se usó la L-glutamina y se usaron 2x10<sup>6</sup> células para la inoculación en ratones hembras desnudos. El manejo de la línea celular de cáncer de ovario humano OVCAR-3 (ATCC) fue el mismo que el de LNCaP, excepto que se usó el medio DMEM y se usaron 5 x 10<sup>6</sup> células para la inoculación en ratones hembras desnudos. La línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 (CL-161) es una línea clonada de MCF-7 (ATCC) y el crecimiento de sus xenoinjertos ya no necesita un suministro exógeno de estrógenos. El cultivo de las células MCF-7 fue similar al de LNCaP, excepto se usaron el medio MEM suplementado con aminoácidos no esenciales 1 mM, piruvato de sodio 1 mM y 0,01 mg/ml de insulina bovina para reemplazar el medio RPMI-1640. La inoculación de las células MCF-7 fue la misma que la de LNCaP, excepto que se usaron 0,1 ml de PBS con Matrigel (1:1) y ratones hembra para el desarrollo de tumores.

La fuente del ITE es la misma que la descrita en el Ejemplo 1. El compuesto ITK (Fórmula Estructural 2), uno de los análogos estructurales del ITE, fue sintetizado por Shanghai ChemPartner Co., Ltd. (Shanghai, China). El número de lote fue: AhR-ITK-001.

## Resultados y Discusión

Se demostró que el ITK (uno de los análogos estructurales del ITE) es eficaz a 20 mg/kg de peso corporal. (i.p. una vez al día) y funcionó incluso mejor que el ITE en el mismo régimen en el modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata humano (LNCaP) (Figura 2A). Las TGI (Inhibición del Crecimiento del Tumor) fueron 51 % (p < 0,003, n = 8) y 64 % (p < 0,021, n = 8) para el ITK e el ITE, respectivamente, en el día 28. Los TGD (Tumor Growth Delay) para el ITK y el ITE fueron de 16 y 8 días, respectivamente, a un volumen tumoral de 1000 mm<sup>3</sup>.

65



Tanto el ITE como el ITK a 80 mg/kg (i.p. una vez al día) demostraron una buena eficacia en la inhibición del crecimiento de xenoinjertos de cáncer de hígado humano (HepG2). El rendimiento del ITE y del ITK fue muy comparable en este modelo (Figura 2B). Las TGI para el ITE y para el ITK fueron 25 % ( $p < 0,001$ ,  $n = 8$ ) y 22 % ( $p < 0,001$ ,  $n = 8$ ), respectivamente, en el día 22. Los TGD fueron de 29 y 26 días con un volumen tumoral de 800 mm<sup>3</sup> para el ITE y el ITK, respectivamente. No hubo una pérdida de peso corporal neta obvia (datos no mostrados) a pesar de que había 1 de cada 8 ratones en el grupo ITK fallecidos al día 32.

Tanto el ITE como el ITK a 80 mg/kg (i.p. una vez al día) nuevamente demostraron una eficacia similar en la inhibición del crecimiento del cáncer de ovario humano (OVCAR-3) (Figura 2C). Las TGI fueron 47 % ( $p < 0,002$ ,  $n = 8$ ) y 46 % ( $p < 0,001$ ,  $n = 8$ ) en el día 33 para el ITE y el ITK, respectivamente. Los TGD para el ITE y para el ITK fueron, respectivamente, de 10 y 13 días con un volumen tumoral de 800 mm<sup>3</sup>. No hubo una pérdida de peso corporal neta obvia (datos no mostrados). Hubo nuevamente 1 de cada 8 ratones en el grupo ITK que murió también al día 32.

El ITE mostró una eficacia modesta, aunque a una dosis moderada (20 mg/kg, i.p. una vez al día), en la inhibición del crecimiento del cáncer de mama humano (MCF-7) (Figura 2D). Se calculó la TGI como 71 % ( $p < 0.031$ ,  $n = 8$ ) al día 19 para el tratamiento con el ITE. Un TGD de 3 días con un volumen tumoral de 500 mm<sup>3</sup> se obtuvo para el grupo ITE. Ciertamente, se necesita un aumento adicional en los niveles de dosificación para producir una mejor inhibición y retraso del crecimiento, pero la respuesta de los xenoinjertos de MCF-7 al tratamiento con el ITE estaba allí.

El rendimiento de uno de los análogos estructurales del ITE (ITK) en este ejemplo valida un enorme potencial de desarrollo de análogos del ITE basado en un marco especificado por la Fórmula Estructural 4. Además, se considera que un análogo con un grupo funcional de tiol éster que reemplaza el éster normal (oxígeno) en la estructura del ITE es especialmente importante dados los resultados de los estudios con el ITK (Fórmula Estructural 2). El tiol éster (S, azufre) así especificado por la Fórmula Estructural 3 se abrevia, así como ITSE. La característica estructural del ITK y del ITSE puede ayudar a defenderse de los ataques de numerosas esterasas en sistemas biológicos específicamente al oxígeno del grupo funcional éster en la estructura del ITE.

### Ejemplo 3

#### 30 Materiales y Métodos

La línea celular Murina de cáncer de pulmón de Lewis LLC (ATCC) se cultivó como se describió para la LNCaP en el Ejemplo 1 excepto que se usó el medio DMEM, en lugar de RPMI-1640. Cada ratón hembra C57BL/6, de 6 a 8 semanas de edad, se inoculó con  $3 \times 10^5$  células de LLC en 0,1 ml de PBS para el desarrollo de los tumores. El tratamiento con el ITE se inició cuando el volumen tumoral medio alcanzó de 80 a 120 mm<sup>3</sup>. Todos los demás materiales y metodologías fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 1.

Resultados y Discusión

El beneficio de usar el modelo de xenoinjerto es que los cánceres humanos pueden ser probados directamente en animales. La desventaja, sin embargo, es que los ratones tienen que tener defectos en sus sistemas inmunes para que no rechacen las células cancerosas humanas. Es obvio, por lo tanto, que este tipo de modelos no pueden usarse para evaluar si el ITE puede estimular el sistema inmunológico para mejorar drásticamente su terapia. Luego se usó un modelo singénico, células tumorales de ratón inoculadas en ratones con sistemas inmunes sanos. A la dosis de 20 mg/kg de peso corporal. (i.p. una vez al día), mientras que el ITE mostró una inhibición del crecimiento del cáncer de pulmón de ratón ( $n = 8$ , TGI = 65 % en el día 15, figura 3A), no hubo indicios de eliminación o erradicación del cáncer. De hecho, el crecimiento del tumor fue tan agresivo en este modelo que el experimento tuvo que ser detenido antes para aliviar el sufrimiento de los animales en los grupos control e ITE debido a la gran carga tumoral.

A la dosis de 80 mg/kg de peso corporal. (i.p. una vez al día), el ITE mejoró significativamente la inhibición del crecimiento de los tumores para que el grupo tratado con el ITE pudiera mantenerse hasta el final del experimento sin término temprano (Figura 3B) como antes. La TGI en el día 20 para el tratamiento con el ITE fue 42 % ( $n = 8$ ,  $p < 0.037$ ) y el TGD con un volumen tumoral de 1000 mm<sup>3</sup> fue de 7 días. Uno de los ratones en el grupo ITE (ratón núm 33) comenzó a reducir su tumor al comienzo del tratamiento con el ITE y siguió haciéndolo hasta que su tumor ya no era palpable en el día 13 (Figura 3C). El ratón se mantuvo libre de tumor durante el resto de la fase de tratamiento con el ITE (total de 28 días). Luego se le dio un mes más al ratón después de la interrupción del tratamiento de 28 días para la posible regresión de su tumor. Pero eso no sucedió y el ratón se mantuvo libre de tumor durante todo el mes de observación, lo que sugiere la eliminación de todas las células cancerosas por el tratamiento (Figura 3C). La monitorización del cambio de peso corporal indicó que el ratón núm 33 y los otros ratones en el grupo ITE toleraron bien el tratamiento (Figura 3D).

Con los modelos de xenoinjerto, la eliminación completa del tumor nunca ha sucedido a una dosis de 80 mg/kg de peso corporal. (i.p. una vez al día) o incluso a 80 mg/kg dosificado (i.p.) dos veces al día. Eso puede argumentar a favor de la estimulación del sistema inmune en ratones de este modelo singénico. En realidad, los resultados en el Ejemplo 4 más abajo también pueden apoyar esta noción al mostrar un aumento en el recuento de glóbulos blancos, neutrófilos, linfocitos y plaquetas a una dosis alta (500 mg/kg, i.p. una vez al día) y meda (100 mg/kg, i.p. una vez al día) pero no a una baja (20 mg/kg, i.p. una vez al día). La erradicación del cáncer, por lo tanto, puede lograrse si el sistema inmunitario pudiera

movilizarse para ayudar a combatir los cánceres y limpiar las células cancerosas individuales, mientras que el crecimiento del cáncer podría inhibirse y atacarse de manera efectiva al mismo tiempo.

#### Ejemplo 4

#### Material y Métodos

La nano-suspensión del ITE se preparó moliendo polvo del ITE en agua que contiene 1 % de CMC-Na (carboximetilcelulosa de sodio), 0,5 % de SLS (laurilsulfato de sodio), 0,085 % de PVP K90 (polivinilpirrolidona K90) y 0,2 % de benzoato con una Máquina de Moler Medio Húmedo (Dispermat SL-nano, WAB Willy A. Bachofen AG, Muttentz, Suiza) hasta alcanzar el intervalo de tamaño deseado. El tamaño de partícula se determinó por un Analizador de Tamaño de Partículas por Difracción Láser (MS2000, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Los parámetros de los tamaños de partícula se determinaron como D10 (diámetro del 10 % de las partículas) = 67 nm, D50 = 114 nm y D90 = 207 nm. La nano-suspensión así preparada se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Los Ratones hembra C57BL/6, de 6 a 8 semanas de edad, fueron asignados aleatoriamente a 4 grupos de dosis (0, 20, 100 y 500 mg/kg pc) cada uno con 6 animales. La nano-suspensión de ITE se administró por inyección i.p. una vez al día durante 7 días consecutivos. Se registraron la mortalidad, los signos clínicos, el peso corporal y el consumo de alimentos. Se recolectaron datos sobre hematología (3 de 6 ratones) y química del suero (los otros 3 de 6 ratones). Los parámetros TK (Toxicocinéticos) se determinaron como se describió en el Ejemplo 1 y los niveles plasmáticos de ITE se midieron a las 1 y 3 h posteriores a la dosificación en los días 1, 3 y 7. Se realizó una observación general de los órganos principales en la necropsia.

#### Resultados y Discusión

Los datos de TK confirmaron la exposición adecuada del sistema ITE (datos no mostrados). No se observó mortalidad excepto que un ratón en el grupo de 20 mg/kg de peso corporal. (dosis baja) murió sin causa conocida antes del segundo día de dosificación. No hubo una pérdida de peso corporal significativa debido a los tratamientos con ITE a pesar de que se notó una disminución dramática en el consumo de alimentos en los 3 grupos tratados con ITE en el día 1 del estudio. No se observó anormalidad en la inspección de órganos principales de todos los grupos tratados con ITE en la necropsia. Los niveles de ALT (alanina aminotransferasa), AST (aspartato aminotransferasa) y TP (proteína total) del grupo de 500 mg/kg (dosis alta) aumentaron en 3,2 ( $p < 0,05$ ), 1,8 (no significativo) y 1,2 ( $p < 0,05$ ) veces, respectivamente, sobre el vehículo control (Tabla 1). El BUN (nitrógeno ureico en sangre) del grupo de 20 mg/kg (dosis baja) aumentó 1,4 veces ( $p < 0,05$ ) sobre el vehículo. Estos datos, especialmente el de ALT, pueden sugerir una aproximación cercana al límite superior de la dosis de ITE. El WBC (recuento de glóbulos blancos) se elevó en 2,6 ( $p < 0,05$ ) y 2,0 veces (no significativo) para el grupo de 100 (medio) y 500 mg/kg (alto), respectivamente. Otros, como el porcentaje de PLT (plaquetas), el porcentaje de NEUT (neutrófilos), el número de neutrófilos (#NEUT) y el número de linfocitos (#LYMPH) aumentaron en los grupos de 100 y 500 mg/kg, aunque no fue estadísticamente significativo (Tabla 1) Los datos en hematología, aunque se necesitan más estudios confirmatorios, pueden sugerir la movilización del sistema inmune por el ITE, reverberando probablemente a los datos de erradicación del cáncer presentados en el Ejemplo 3.

**Tabla 1.** Lecturas parciales en hematología sobre química del suero

Dosis (mg/kg)	ALT U/l	AST U/l	BUN mmol/l	TP (g/l)	WBC ( $\times 10^9$ células)	PLT ( $\times 10^9$ células)	NEUT (%)	#NEUT ( $\times 10^9$ células)	#LYMPH ( $\times 10^9$ células)
0	23,6 (6,4)	84,3 (37,9)	7,6 (1,2)	39,7 (3,3)	4,22 (1,85)	539 (218)	19,4 (4)	0,87 (0,67)	3,09 (1,82)
20	43,2 (43,7)	118,1 (41,7)	10,5* (0,3)	39,5 (2,7)	4,68 (0,04)	435 (295)	23,3 (no)	1,08 (no)	3,35 (no)
100	33,2 (10,2)	131,6 (27,8)	7,3 (1,6)	40,8 (3,3)	10,77* (4,26)	668 (202)	46,6 (no)	3,62 (no)	3,5 (no)
500	74,5* (21,6)	151,2 (37,1)	9,1 (0,3)	49,5* (1,5)	8,38 (1,32)	1.075 (99)	40,5 (3,4)	3,4 (0,64)	4,81 (0,81)

La Tabla 1 presenta las lecturas parciales sobre hematología y química del suero, en donde los listados son medias de los grupos con la SD (desviación estándar) dentro de los paréntesis, y en donde el \* representa la significación estadística ( $p < 0,05$ ), y en donde el "no" significa que la desviación estándar no está disponible debido al tamaño de la muestra, y en donde ALT significa alanina aminotransferasa, AST aspartato aminotransferasa, TP proteína total, BUN nitrógeno ureico en sangre, WBC recuento de glóbulos blancos, PLT plaquetas, NEUT neutrófilos, #NEUT número de neutrófilos y #LYMPH número de linfocitos.

## Aplicabilidad Industrial

La presente invención se puede aplicar al área de intervención o erradicación del cáncer para seres humanos y otros animales, especialmente mamíferos.

5

## Lista de signos de referencia

Como se usa en la presente descripción, el término "análogo estructural" o simplemente "análogo" del ITE se define como un compuesto con estructura química similar a la del ligando endógeno ITE del AhR y como se define en la reivindicación 1.

10

Como se usa en la presente descripción, el término "alquilo" representa un grupo de hidrógeno saturado de uno a seis carbonos conectados de manera lineal o ramificada.

15

Como se usa en la presente descripción, el término "haloalquilo" representa un alquilo sustituido con uno o más átomos de halógeno.

Como se usa en la presente descripción, el término "alqueno" representa un grupo de hidrocarburos que contienen de dos a seis carbonos conectados de manera lineal o ramificada con al menos un doble enlace carbono-carbono.

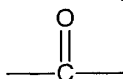
20

Como se usa en la presente descripción, el término "alquino" representa un grupo de hidrocarburos que contienen de dos a seis carbonos conectados de manera lineal o ramificada con al menos un triple enlace carbono-carbono.

Como se usa en la presente descripción, el término "halo" representa cualquiera de los átomos de halógeno (F, Cl, Br o I).

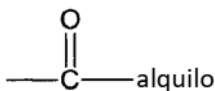
25

Como se usa en la presente descripción, el término "carbonilo" representa:



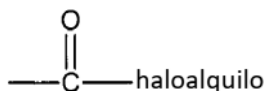
30

Como se usa en la presente descripción, el término "alcanoilo" representa un alquilo conectado a un grupo carbonilo:



35

Como se usa en la presente descripción, el término "haloalcanoilo" representa un haloalquilo conectado a un grupo carbonilo:



40

Como se usa en la presente descripción, el término "grupo protector de nitrógeno" representa grupos comúnmente usados para proteger el nitrógeno de las reacciones químicas no deseadas durante los procedimientos de síntesis.

45

Como se usa en la presente descripción, el término "amino" representa  $\text{-NR}_a\text{R}_b$  donde  $\text{R}_a$  y  $\text{R}_b$  pueden seleccionarse independientemente de hidrógeno, halo, formilo (-CHO), alquilo, haloalquilo, alqueno, alquino, alcanoilo, haloalcanoilo o un grupo protector de nitrógeno.

50

Como se usa en la presente descripción, el término "alcoxi" representa un alquilo conectado a un átomo de oxígeno (-O-alquilo).

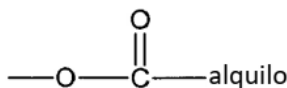
Como se usa en la presente descripción, el término "haloalcoxi" representa un haloalquilo conectado a un átomo de oxígeno (-O-haloalquilo).

55

Como se usa en la presente descripción, el término "tioalcoxi" representa un alquilo conectado a un átomo de azufre (-S-alquilo).

Como se usa en la presente descripción, el término "carboniloxi" representa un alcanoilo conectado a un átomo de oxígeno:

60



65

## Lista de citas

## Literatura de Patentes

7. DeLuca HF, Clagett-Dame M, Song J, Helfand S, Akhtar N. Patente de los Estados Unidos: 7419992 - Use of aryl hydrocarbon receptor ligand as a therapeutic intervention in angiogenesis-implicated disorders. 2008. Disponible en: <http://patft.uspto.gov/> [Accedido el 7 de octubre del 2009].

10. DeLuca HF, Jiasheng Song, Clagett-Dame M, y otros. Patente de los Estados Unidos: 6916834 - Preparations and use of an Ah receptor ligand, 2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester. 2005. Disponible en: <http://patft.uspto.gov/> [Accedido el 7 de octubre del 2009].

## 10 Literatura no de Patentes

1. Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1982;22:517-554.

2. Poellinger L. Mechanistic aspects--the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *Food Addit Contam.* 2000;17(4):261-6.

3. Bock KW, Köhle C. Ah receptor- and TCDD-mediated liver tumor promotion: clonal selection and expansion of cells evading growth arrest and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 2005;69(10):1403-1408.

4. Stevens EA, Mezrich JD, Bradfield CA. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology.* 2009;127(3):299-311.

5. Puga A, Tomlinson CR, Xia Y. Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(2):199-207.

6. Safe S, McDougal A. Mechanism of action and development of selective aryl hydrocarbon receptor modulators for treatment of hormone-dependent cancers (Review). *Int J Oncol.* 2002;20(6):1123-8.

8. Dietrich C, Kaina B. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis.* 2010;31(8):1319-1328.

9. Song J, Clagett-Dame M, Peterson RE, y otros. A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(23):14694-9.

11. Fritz WA, Lin T, Safe S, Moore RW, Peterson RE. The selective aryl hydrocarbon receptor modulator 6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran inhibits prostate tumor metastasis in TRAMP mice. *Biochem. Pharmacol.* 2009;77(7):1151-1160.

12. McDougal A, Wilson C, Safe S. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumor growth by aryl hydrocarbon receptor agonists. *Cancer Lett.* 1997;120(1):53-63.

13. Holcomb M, Safe S. Inhibition of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary tumor growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Lett.* 1994;82(1):43-7.

14. McDougal A, Wormke M, Calvin J, Safe S. Tamoxifen-induced antitumorigenic/antiestrogenic action synergized by a selective aryl hydrocarbon receptor modulator. *Cancer Res.* 2001;61(10):3902-3907.

15. Gierthy JF, Bennett JA, Bradley LM, Cutler DS. Correlation of in vitro and in vivo growth suppression of MCF-7 human breast cancer by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res.* 1993;53(13):3149-3153.

16. Zhang S, Lei P, Liu X, y otros. The aryl hydrocarbon receptor as a target for estrogen receptor-negative breast cancer chemotherapy. *Endocr. Relat. Cancer.* 2009;16(3):835-844.

17. Kawajiri K, Kobayashi Y, Ohtake F, y otros. Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009;106(32):13481-13486.

18. Simon T, Aylward LL, Kirman CR, Rowlands JC, Budinsky RA. Estimates of cancer potency of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo(p)dioxin using linear and nonlinear dose-response modeling and toxicokinetics. *Toxicol. Sci.* 2009;112(2):490-506.

19. Ishida M, Mikami S, Kikuchi E, y otros. Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway enhances cancer cell invasion by upregulating the MMP expression and is associated with poor prognosis in upper urinary tract urothelial cancer. *Carcinogenesis.* 2010;31(2):287-295.

20. Ray S, Swanson HI. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by TCDD inhibits senescence: a tumor promoting event? *Biochem. Pharmacol.* 2009;77(4):681-688.

21. Knerr S, Schrenk D. Carcinogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in experimental models. *Mol Nutr Food Res.* 2006;50(10):897-907.

22. John AR, Bramhall SR, Eggo MC. Antiangiogenic therapy and surgical practice. *Br J Surg.* 2008;95(3):281-293.

23. Roukos DH, Tzakos A, Zografos G. Current concerns and challenges regarding tailored anti-angiogenic therapy in cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009;9(10):1413-1416.

24. English BC, Price DK, Figg WD. VEGF inhibition and metastasis: possible implications for antiangiogenic therapy. *Cancer Biol. Ther.* 2009;8(13):1214-1225.

25. Loges S, Mazzone M, Hohensinner P, Carmeliet P. Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited. *Cancer Cell.* 2009;15(3):167-170.

26. Ebos JML, Lee CR, Cruz-Munoz W, y otros. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell.* 2009;15(3):232-239.

27. Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, y otros. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell.* 2009; 15(3):220-231.

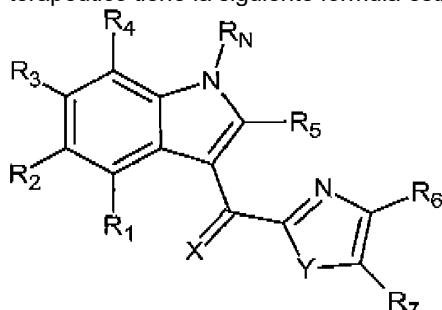
28. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, y otros. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature.* 2008;453(7191):65-71.

29. Henry EC, Bemis JC, Henry O, Kende AS, Gasiewicz TA. A potential endogenous ligand for the aryl hydrocarbon receptor has potent agonist activity in vitro and in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 2006;450(1):67-77.

30. Brauze D, Widerak M, Cwykiel J, Szyfter K, Baer-Dubowska W. The effect of aryl hydrocarbon receptor ligands on the expression of AhR, AhRR, ARNT, Hif1alpha, CYP1A1 and NQO1 genes in rat liver. *Toxicol. Lett.* 2006;167(3):212-220.
31. Bermúdez de León M, Gómez P, Elizondo G, y otros. Beta-naphthoflavone represses dystrophin Dp71 expression in hepatic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1759(3-4):152-158.
32. Okino ST, Pookot D, Basak S, Dahiya R. Toxic and chemopreventive ligands preferentially activate distinct aryl hydrocarbon receptor pathways: implications for cancer prevention. *Cancer Prev Res (Phila Pa).* 2009;2(3):251-256.
33. Morrow D, Qin C, Smith R, Safe S. Aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition of LNCaP prostate cancer cell growth and hormone-induced transactivation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004;88(1):27-36.
34. Sanderson JT, Slobbe L, Lansbergen GW, Safe S, van den Berg M. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and diindolylmethanes differentially induce cytochrome P450 1A1, 1B1, and 19 in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Sci.* 2001;61(1):40-48.
35. Elizondo G, Fernandez-Salguero P, Sheikh MS, y otros. Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. *Mol Pharmacol.* 2000;57(5):1056-63.
36. Puga A, Marlowe J, Barnes S, y otros. Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology.* 2002;181-182:171-7.
37. Marlowe JL, Knudsen ES, Schwemberger S, Puga A. The aryl hydrocarbon receptor displaces p300 from E2F-dependent promoters and represses S phase-specific gene expression. *J Biol Chem.* 2004;279(28):29013-22.
38. Kajta M, Wójtowicz AK, Maćkowiak M, Lasoń W. Aryl hydrocarbon receptor-mediated apoptosis of neuronal cells: a possible interaction with estrogen receptor signaling. *Neuroscience.* 2009;158(2):811-822.
39. Singh NP, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Primary peripheral T cells become susceptible to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated apoptosis in vitro upon activation and in the presence of dendritic cells. *Mol. Pharmacol.* 2008;73(6):1722-1735.
40. Park K, Mitchell KA, Huang G, Elferink CJ. The aryl hydrocarbon receptor predisposes hepatocytes to Fas-mediated apoptosis. *Mol Pharmacol.* 2005;67(3):612-22.
41. Jux B, Kadow S, Esser C. Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J. Immunol.* 2009;182(11):6709-6717.
42. Sutter CH, Yin H, Li Y, y otros. EGF receptor signaling blocks aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription and cell differentiation in human epidermal keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009;106(11):4266-4271.
43. Hall JM, Bar Hoover MA, Kazmin D, y otros. Activation of the Aryl-Hydrocarbon Receptor Inhibits Invasive and Metastatic Features of Human Breast Cancer Cells and Promotes Breast Cancer Cell Differentiation. *Mol Endocrinol.* 2009. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032195> [Accedido el 27 de enero del 2010].
44. Oenga GN, Spink DC, Carpenter DO. TCDD and PCBs inhibit breast cancer cell proliferation in vitro. *Toxicol In Vitro.* 2004;18(6):811-9.
45. Jana NR, Sarkar S, Ishizuka M, y otros. Cross-talk between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and testosterone signal transduction pathways in LNCaP prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;256(3):462-8.
46. Morrow D, Qin C, Smith R, Safe S. Aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition of LNCaP prostate cancer cell growth and hormone-induced transactivation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;88(1):27-36.
47. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, y otros. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature.* 2008;453(7191):106-109.
48. Koliopanos A, Kleeff J, Xiao Y, y otros. Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for pancreatic cancer. *Oncogene.* 2002;21 (39):6059-70.
49. Kashani M, Steiner G, Haitel A, y otros. Expression of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in fetal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate.* 1998;37(2):98-108.
50. Gluschnaider U, Hidas G, Cojocar G, y otros. beta-TrCP inhibition reduces prostate cancer cell growth via upregulation of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS ONE.* 2010;5(2):e9060.
51. Peng T, Chen J, Mao W, y otros. Potential therapeutic significance of increased expression of aryl hydrocarbon receptor in human gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 2009;15(14):1719-1729.

REIVINDICACIONES

1. Un agente terapéutico para el uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y cáncer de mama, y en donde dicho agente terapéutico tiene la siguiente fórmula estructural:



en donde:

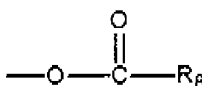
X e Y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en O (oxígeno) y S (azufre);

R<sub>N</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, ciano, formilo, alquilo, haloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcanoilo, haloalcanoilo y un grupo protector de nitrógeno;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, hidroxilo (-OH), tiol (-SH), ciano (-CN), formilo (-CHO), alquilo, haloalquilo, alquenilo, alquinilo, amino, nitro (-NO<sub>2</sub>), alcoxi, haloalcoxi, tioalcoxi, alcanoilo, haloalcanoilo y carboniloxi;

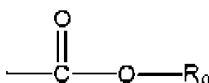
R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, hidroxilo, tiol, ciano, formilo, alquilo, haloalquilo, alquenilo, alquinilo, amino, nitro, alcoxi, haloalcoxi y tioalcoxi; o

R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son independientemente:



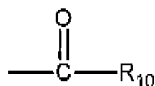
en donde R<sub>8</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, ciano, alquilo, haloalquilo, alquenilo y alquinilo; o

R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son independientemente:



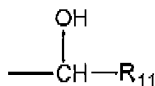
en donde R<sub>9</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo, haloalquilo, alquenilo y alquinilo; o

R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son independientemente:



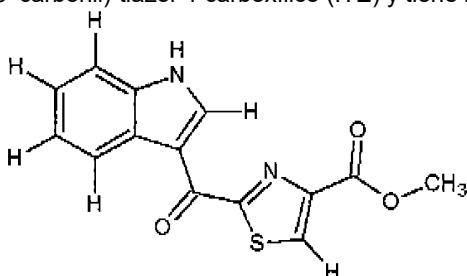
en donde R<sub>10</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, hidroxilo, tiol, ciano, alquilo, haloalquilo, alquenilo, alquinilo, amino y nitro; o

R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son independientemente:

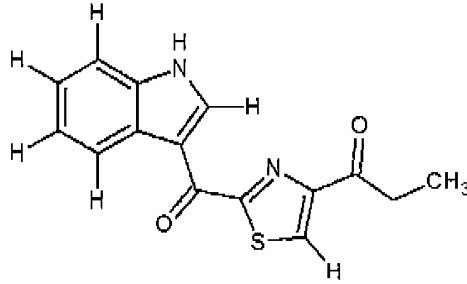


en donde R<sub>11</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo, haloalquilo, alquenilo y alquinilo.

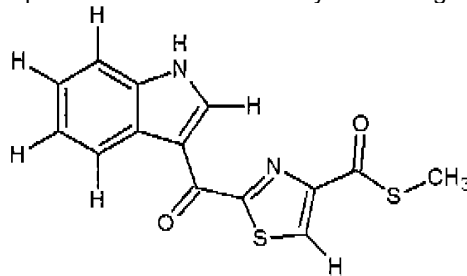
2. El agente terapéutico para el uso de conformidad con la reivindicación 1, en donde el agente terapéutico es el éster metílico del ácido 2-(1'H-indol-3'-carbonil)-tiazol-4-carboxílico (ITE) y tiene la siguiente fórmula estructural:



3. El agente terapéutico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente terapéutico se denomina ITK y tiene la siguiente fórmula estructural:



- 5 4. Un agente terapéutico para el uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y cáncer de mama, y en donde el agente terapéutico se denomina ITSE y tiene la siguiente fórmula estructural:



- 10 5. El agente terapéutico para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho agente terapéutico se proporciona en una composición farmacéutica que comprende uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.
- 15 6. El agente terapéutico para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho agente terapéutico es para el uso en el tratamiento del cáncer en el sujeto mediante aplicación tópica, entérica o parenteral.
- 20 7. El agente terapéutico para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho agente terapéutico es para el uso en el tratamiento del cáncer en el sujeto en combinación con uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer.
8. El agente terapéutico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se proporciona una dosificación de mantenimiento, cuya duración es dirigida por ensayos, del ITE o de uno de sus análogos estructurales, después de que el sujeto esté libre de cáncer para asegurar su erradicación.
- 25 9. El agente terapéutico para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el sujeto es un mamífero.

Figura 1

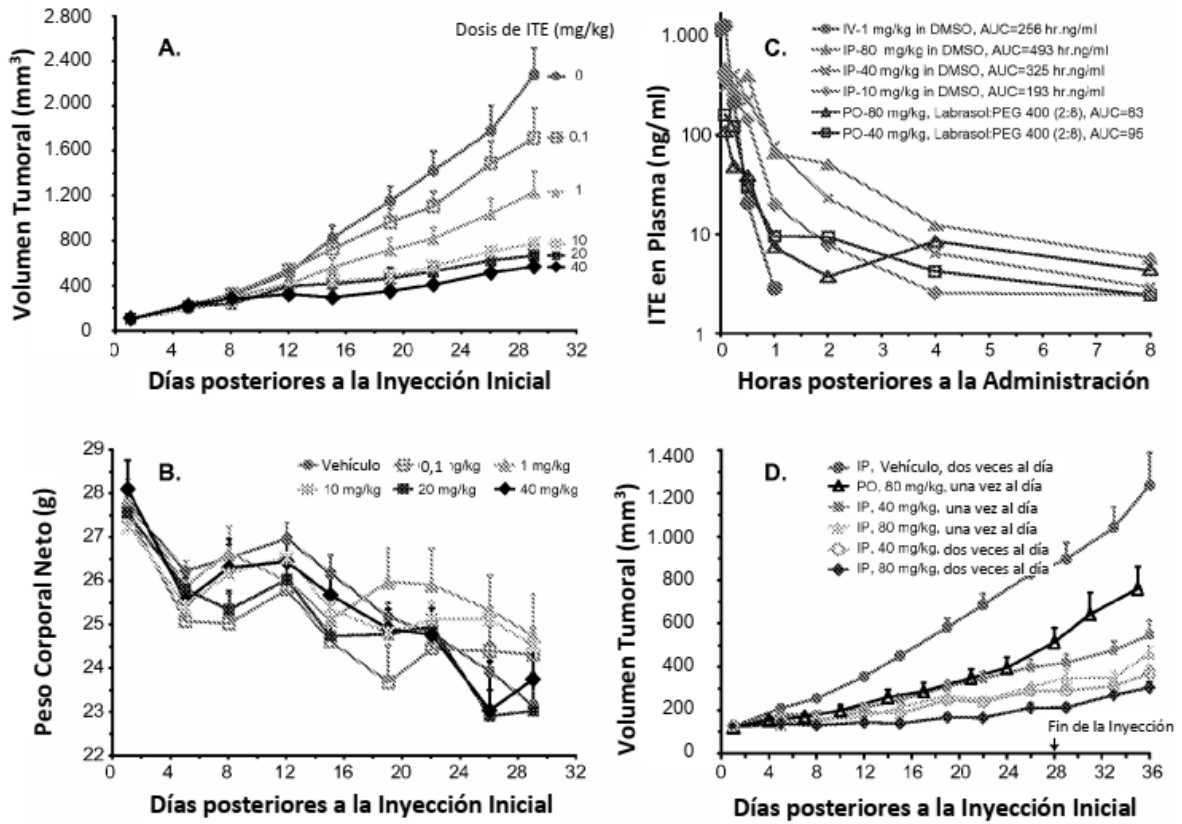




Figura 2

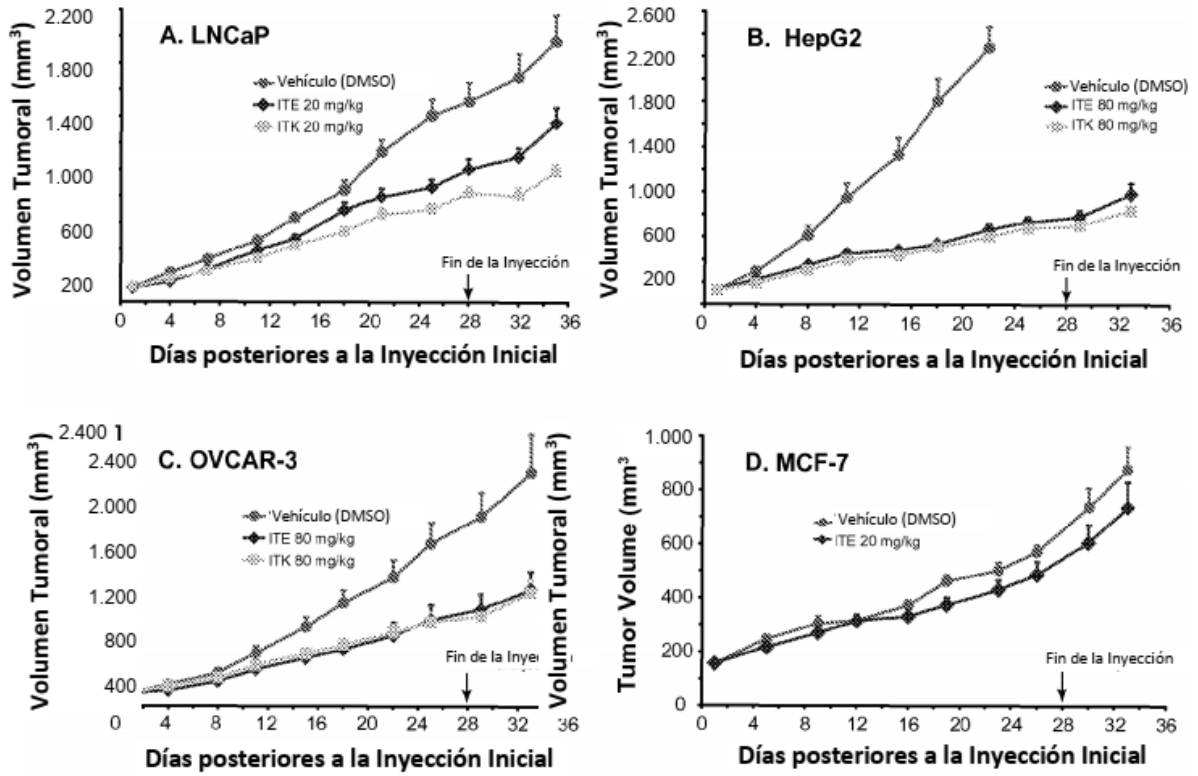


Figura 3

