

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS Y SANITARIAS (IUIBS)

PROGRAMA DE DOCTORADO: SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

**TESIS DOCTORAL** 

# Evaluación farmacológica preclínica de nuevos productos bioactivos con aplicaciones

## como antitumorales



i uniciu iviurum redunguez

Las Palmas de Gran Canaria, 2017

Ilustración de la portada: estructura cristalina del complejo formado por JAK2 (en verde) y SOCS3 (en violeta). Tomado de Kershaw, N.J., et al. 2013. Autora: Haidée Aranda Tavío





## Anexo I

## DÑA. MARÍA SORAYA DÉNIZ SUÁREZ, SECRETARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

### CERTIFICA

Que el Consejo de Doctores del Instituto en su sesión de fecha 06 de junio, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada: "Evaluación farmacológica preclínica de nuevos productos bioactivos con aplicaciones como antitumorales" presentada por la doctorando Dña. Patricia Martín Rodríguez y dirigida por los Dres. D. Leandro Fernández Pérez, D. Carlos Borja Guerra Hernández y D. Juan Carlos Díaz Chico.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a siete de junio de dos mil diecisiete.





### UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria y Departamento de Ciencias Clínicas

Programa de Doctorado: Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

### Título de la Tesis

# Evaluación farmacológica preclínica de nuevos productos bioactivos con aplicaciones como antitumorales

Tesis Doctoral presentada por D<sup>a</sup> Patricia Martín Rodríguez

Dirigida por los Dres. Leandro Fernández Pérez, Juan Carlos Díaz Chico y C. Borja Guerra Hernández.

La Doctoranda

El Director

El Director

El Director

Patricia Martín Rodríguez Dr. Leandro Fernández Pérez Dr. Juan Carlos Díaz Chico Dr. C. Borja Guerra Hernández

Las Palmas de Gran Canaria, a 14 de Junio de 2017

D. Leandro Fernández Pérez, Catedrático del Departamento de Ciencias
Clínicas, D. Juan Carlos Díaz Chico, Catedrático del departamento de
Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología, y D.
C. Borja Guerra Hernández, Profesor Titular del Departamento de Ciencias
Clínicas.

### CERTIFICAN,

Que D<sup>a</sup> Patricia Martín Rodríguez, licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección y asesoramiento el trabajo de investigación titulado:

# Evaluación farmacológica preclínica de nuevos productos bioactivos con aplicaciones como antitumorales

Una vez revisada la presente memoria, la encuentran apta para su defensa ante el tribunal para la obtención del título de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende la presente certificación en Las Palmas de Gran Canaria a 14 de Junio de 2017

Fdo. D. Leandro Fernández Pérez Fdo. D. Juan Carlos Díaz Chico Fdo. D. C. Borja Guerra Hernández



# UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS Y SANITARIAS (IUIBS)

# PROGRAMA DE DOCTORADO: SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Grupo de Investigación en Farmacología Molecular y Traslacional

## **TESIS DOCTORAL**

# Evaluación farmacológica preclínica de nuevos productos bioactivos con aplicaciones como antitumorales

Patricia Martín Rodríguez

Las Palmas de Gran Canaria, 2017

A mi abuela, allá donde estés

A mis padres

A mi hermana

A mi marido. A mi hija

### RESUMEN

El cáncer es una de las principales enfermedades a nivel global. A pesar de los grandes avances terapéuticos, muchos de los fármacos utilizados hoy en día presentan baja selectividad y elevada toxicidad. Además, el desarrollo de resistencias tumorales al tratamiento que resultaba primariamente eficaz es un problema clínico muy común. Esto hace necesaria la búsqueda de alternativas farmacológicas con una mejor relación beneficio/riesgo. En este sentido, los productos naturales resultan ser una fuente muy relevante de estructuras químicas con interés biomédico. Particularmente, las naftoquinonas y sus derivados se consideran estructuras químicas privilegiadas para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales.

En esta Tesis, utilizando una estrategia basada en el cribado fenotípico de quimiotecas enriquecidas en derivados de naftoquinonas, se seleccionaron los productos denominados CM363 e ihf-c6. Estos mostraron una mayor eficacia antitumoral en leucemias donde la ruta de señalización JAK2/STAT5 es biológicamente relevante, especialmente en modelos celulares de Leucemia Mieoloide Crónica (CML) y Eritroleucemia Humana (HEL). En la CML, su eficacia in vitro, se asoció con la inhibición de la ruta de señalización, constitutivamente activa, Brc-Abl/JAK2/STAT5. La actividad del CM363 se asoció, entre otros fenómenos moleculares, con: 1) parada del ciclo celular en fase S, 2) muerte de la célula por apoptosis, 3) activación de JNK, 4) liberación del citocromo C, 5) activación de las caspasas -3 -9, 6) activación de Chk1 y Chk2, 7) inhibición de la expresión y/o actividad de Cdc25, 8) reducción de la expresión de Mcl-1 y 9) incremento de los niveles de la proteína yH2AX. Particularmente relevante, resultó el que ambos compuestos se mostraran eficaces en células de leucemia resistentes al imatinib, el antitumoral utilizado en clínica, potenciando, en el caso de CM363, la actividad antitumoral del mismo. Finalmente, cabe destacar que CM363 mostró una importante eficacia antitumoral *in vivo*, en un modelo de ratones con xenoinjertos de CML humanas.

En conclusión, esta Tesis Doctoral aporta evidencias experimentales que sugieren que el desarrollo de nuevos derivados naftoquinónicos puede tener un enorme interés para la terapia farmacológica de las leucemias humanas.

# ÍNDICE

Abreviaturas	1
--------------	---

Introducción7			
1.	Cánc	er	9
	1.1.	Aspectos generales	9
	1.2.	Señas distintivas de los tumores	9
2.	La rı	ıta de señalización intracelular JAK	.12
	2.1.	Descripción y relevancia fisiológica	.12
	2.2.	Regulación negativa de la ruta	.18
	2.3.	Su importancia en cáncer y otras patologías	.22
	2.4.	La ruta de señalización JAK/STAT como diana antitumoral	.24
	2.5. de siner	Resistencia a fármacos antitumorales: necesidad de búsqueda gias	.30
3.	Desa	rrollo de nuevos fármacos	.34
	3.1. estrateg	Los productos naturales como fuente de nuevos fármacos y gias de cribado de librerías de productos	.34
	3.2. naturale	Búsqueda de compuestos antitumorales a partir de productos	.40
	3.3.	Naftoquinonas y derivados como fármacos antitumorales	.42
Plan	teamien	to y Objetivos	.45
Mat	erial y N	Iétodos	. 49
1.	Ager	ntes farmacológicos	.51
2.	Célu	las	.52
3.	Anti	cuerpos	.54
4.	Ensa	yos de viabilidad celular	.56
	4.1. methylt	Ensayo de reducción metabólica de la sal de 3-(4,5- iazol- 2yl-)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)	.56

4.	2. Fotomicroscopía a tiempo real	56
5.	Ensayos de luciferasa con genes reporteros	57
6. apor	Ensayos para el análisis del ciclo celular y evaluación de la ptosis	58
7.	Análisis de la interacción STAT-ADN	59
8.	Inmunodetección de proteínas. Ensayos de Western Blot	60
9. real	Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tier (qPCR)	npo 61
10. de C	Análisis de la combinación de fármacos (determinación del Ír Combinación)	dice 63
11.	Análisis del efecto de CM363 sobre xenoinjertos de tumores	
hum	anos en ratones	64
12.	Análisis estadístico	65

### Capítulo I. Evaluación de la actividad antitumoral del compuesto

C	M363	3	. 67
	1.	CM363 inhibe la viabilidad de células de leucemia humana	.69
	2.	CM363 inhibe la transcripción dependiente de STAT5 y STAT3	.74
	3.	CM363 bloquea el ciclo celular en células CML	.75
	4.	CM363 induce apoptosis en células CML	. 79
	5.	CM363 inhibe la ruta de señalización Bcr-Abl-STAT5 en las célul	as
	K56	2	. 82
	6. supe	CM363 actúa sobre otras vías de señalización importantes para la rvivencia en CML	.90
	7. celul	CM363 actúa sinérgicamente con IM para inhibir la viabilidad ar de CML, eludiendo la resistencia a IM.	.94
	8. rator	CM363 inhibe el crecimiento de xenoinjertos humanos de CML en nes atímicos	1 .97

### 

2. Ihf-c6 inhibe la ruta de señalización Bcr-Abl-STAT5 y JAK2- STAT5/STAT31	105
3. Ihf-c6 inhibe la unión de STAT3 y STAT5 a su secuencia diana en el ADN	110
4. Ihf-c6 inhibe la transcripción dependiente de STAT5 y STAT3 1	112
5. Ihf-c6 reduce la viabilidad de células de CML resistentes a IM K562-R	113
Discusión	115
Conclusiones1	123
Bibliografía1	129
Anexo I. Financiación	145
Anexo II. Agradecimientos	149
Anexo III. Información complementaria1	155
Anexo IV. Curriculum Vitae1	199

# Abreviaturas

A1	Bcl-2 family apoptosis regulator
Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Protein kinase B
AML	Acute Myeloid Leukemia
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosine triphosphate
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-interactive cell death susceptibility regulator
Bcl-2	Apoptosis regulator
Bcl-w	Bcl-2 family apoptosis regulator
Bcl-XL	Bcl-2 family apoptosis regulator
CD45	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CIS	Cytokine Inducible SH2 Containing Protein
CML	Chronic Myelogenous Leukemia
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Epidermal Growth Factor
EPO	Erytropoyetin
ERK	Extracellular Regulated Kinases
ESS	Extended SH2-subdomain
FBS	Fetal Bovine Serum
GAS	Gamma interferon activation site
GH	Growth Hormone
GHR	Growth Hormone Receptor
HDAC	Histone deacetylases
HSP90	Heat Shock Protein 90 kDa
HEL	Human Erythroleukemia
IM	Imatinib

JAK	Janus Kinase
JH	JAK homology
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase
KIR	Kinase Inhibitory Region
МАРК	Mitogen Activated Protein Kinases
Mcl-1	Bcl-2 family apoptosis regulator
MDS	Myelodysplastic Disorders
MEK	MAPK family kinase
MF	Myelofibrosis
MPD	Myeloproliferative Disorders
MPN	Myeloproliferative Neoplasm
MTT	Tetrazolium salt 3-(4,5-methyltiazol- 2yl-)-2,5diphenyl- tetrazolium bromide
NPQ	Naphthoquinone
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDD	Phenotypic-based Drug Discovery
PDGF	Platelet Derivated Groth Factor
PI-3K	Phosphatidyl Inositol-4,5-biphosphate 3-Kinase
PIAS	Proteins Inhibitor of Activated STAT
PLB	Passive Lysis Buffer
PTP1B	Protein-tyrosine phosphatase 1B
RAS	Small G protein
RAF	Serine/threonine-protein kinase
RMC	Reacción Multicomponente
SH2	Src homology
SHP-1	Src-homology 2 domain (SH2)-containing phosphatase-1
SOCS	Suppressors of Cytokine Signalling
Src	Non receptor tyrosine kinase
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TDD	Target-based Drug Discovery

- TC-PTP T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase
- TKI Tyrosine Kinase Inhibitor
- TYK 2 Non-receptor tyrosine-protein kinase
- VEGF-A Vascular endothelial growth factor-A

# Introducción

#### 1. Cáncer

#### 1.1. Aspectos generales

El cáncer es una de las principales causas de morbi-mortalidad a nivel global, siendo la segunda causa de muerte en nuestro país, según datos de 2015 de la Organización Mundial de la Salud (1). A pesar de los grandes avances terapéuticos conseguidos en los últimos años, hoy en día se continúa investigando con el objetivo de conseguir tratamientos más potentes, más selectivos, y, por tanto, menos tóxicos. Estos avances y este empeño en encontrar mejores terapias se fundamentan en una mejor compresión y un conocimiento más profundo de la biología molecular de los tumores. En este sentido, hoy se sabe que muchos tipos de cáncer se relacionan con la expresión de determinados genes y con un funcionamiento aberrante de ciertas rutas metabólicas (2). Estas alteraciones constituyen dianas terapéuticas muy interesantes.

### 1.2. Señas distintivas de los tumores

Todas las células de mamíferos poseen una maquinaria molecular similar para regular procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. Las células cancerosas presentan modificaciones en el funcionamiento de esta maquinaria con respecto a las células normales. Existen evidencias que indican que la formación de los tumores es un proceso de múltiples pasos, consecuencia de alteraciones genéticas que confieren alguna ventaja para favorecer su desarrollo y que conducen a la transformación progresiva desde células normales a células cancerosas (2, 3).

La gran variedad genotípica de las células tumorales es el resultado de una serie de alteraciones propias de las mismas y que les confieren su identidad. La *autonomía para las señales de crecimiento* es un sello de identidad de las células malignas. De esta forma, las células tumorales son capaces de generar sus propias señales de crecimiento, al contrario de lo que ocurre en células normales, que dependen de estimulación exógena para el crecimiento, proveniente de su microambiente tisular, y del control hormonal (2, 3).

Las células cancerosas son capaces de evadir señales supresoras de crecimiento, alterando la homeostasis natural de las células y tejidos normales. Así, resisten a la muerte celular programada (apoptosis), barrera natural para evitar el desarrollo del cáncer. Alteran el equilibrio en la expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) y proapoptóticas (Bax, Bak) propio de células sanas, aumentando la expresión de unas e inhibiendo la de otras, respectivamente. Otra característica clave de las células tumorales es su capacidad de replicación sin límite que las diferencia de las células normales. La inmensa mayoría de células tumorales expresan telomerasa, una enzima ADN polimerasa que añade segmentos repetidos a los extremos del ADN, evitando el acortamiento de los telómeros. Este fenómeno de acortamiento de los extremos del material genético es propio del mecanismo antiproliferativo de células sanas y está asociado al envejecimiento celular. Este fenómeno se encuentra inhibido en células malignas como consecuencia de la actividad de la telomerasa, entre otros mecanismos (4). Además, los tumores inducen la angiogénesis de una manera casi permanente y no transitoriamente como ocurre en tejidos sanos del individuo adulto, sobre-expresando proteínas inductoras de la misma como el VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A). De esta forma, a lo largo del desarrollo de la mayoría de los tumores humanos, las masas tumorales primarias son capaces de *invadir* tejidos cercanos y *migrar* a otros más distantes, normalmente por alteraciones en su forma y en sus mecanismos de adhesión a otras células y a la matriz extracelular (2, 3, 5). Desde un punto de vista energético, las células cancerosas aumentan el proceso de glicólisis con respecto al proceso de lipólisis, a pesar de ser menos eficiente en la generación de ATP (*adenosine triphosphate*) que la fosforilación oxidativa mitocondrial. Este hecho se justifica porque desvían intermediarios de esta ruta metabólica de la glicólisis hacia rutas de biosíntesis de nucleósidos y aminoácidos, favoreciendo la biosíntesis de macromoléculas y orgánulos para la formación de nuevas células (3).

A pesar de que el sistema inmune vigila constantemente células y tejidos del organismo para reconocer y eliminar la mayoría de los tumores incipientes, éstos son capaces de *evitar su detección* y progresar *evadiendo su destrucción*. Muchos tumores podrían inutilizar componentes del sistema inmune liberando factores inmunosupresores o reclutando células inflamatorias supresoras como las células T, favoreciendo así el desarrollo de los mismos (3). Además, los tumores se caracterizan por una *inflamación* del tejido afectado, y un tejido crónicamente inflamado frecuentemente presenta un incremento de la cantidad de colágeno y fibronectina en su matriz extracelular. La composición de la matriz extracelular puede modificar el estado de activación de algunas de las células del sistema inmune. Así, una matriz extracelular rica en colágeno promueve la proliferación de macrófagos y su polarización hacia el fenotipo pro-tumoral M2 (5).

Finalmente, las células cancerosas exhiben alteraciones genéticas que son debidas a *mutaciones* y *reestructuraciones cromosómicas*. La adquisición de estas modificaciones promueve la transformación de células sanas y facilita la evolución del tumor (5).

# 2. La ruta de señalización intracelular JAK (*Janus Kinase*)/STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*)

### 2.1. Descripción y relevancia fisiológica

Muchas respuestas celulares a citoquinas y factores de crecimiento están mediadas por la ruta JAK/STAT (6). Estas respuestas incluyen proliferación, diferenciación, migración, apoptosis y supervivencia, todos procesos necesarios para el correcto desarrollo y homeostasis de un organismo, y que presentan variaciones según el tipo de señal, el tipo de tejido y el contexto celular (7).

La activación canónica de la ruta comienza con la unión de un ligando a su receptor específico, provocando cambios en el receptor que permiten la asociación de dos proteínas JAK y la autofosforilación de las mismas, activándolas. Una vez han sido activadas, éstas fosforilan el dominio intracelular del receptor, creando sitios de unión para las proteínas STAT, y fosforilando, además, a las propias STAT. Las proteínas STAT fosforiladas forman dímeros que atraviesan la membrana nuclear y se unen a secuencias específicas en los genes diana, regulando su transcripción (7) (Figura 1).



Figura 1. Activación canónica de la ruta JAK/STAT (tomado de (8)).

En mamíferos, existen cuatro proteínas JAK (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2) y siete proteínas STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6), que pueden ser activadas por unas 50 citoquinas y factores de crecimiento distintos. La especificidad de la ruta puede ser explicada en función del contexto celular existente; de esta forma una citoquina determinada responsable de la activación de unos STAT determinados actuaría sobre unos genes u otros dependiendo del tipo celular del que se trate (9).

La señal de identidad de la familia de tirosina quinasas JAK es la organización en tándem de un dominio quinasa y otro pseudoquinasa, además de otros cinco dominios, todos denominados dominios JH (*JAK homology*) y

numerados consecutivamente (1 - 7). El dominio JH1 es el dominio quinasa y el JH2 es el dominio pseudoquinasa, que en los últimos años se ha visto que posee un papel regulador de la actividad catalítica de JAK. Además, recientemente se ha demostrado que el dominio pseudoquinasa JH2 de JAK2 es capaz de unir ATP y posee una pequeña actividad catalítica, además de regular negativamente la actividad del dominio quinasa. Esta actividad reguladora tiene un papel muy importante ya que se sabe que mutaciones en JH2 se asocian directamente con trastornos hematológicos e inmunológicos, aunque el mecanismo molecular de la actividad reguladora aún no haya sido aclarado completamente (10). El extremo amino terminal de las proteínas JAK participa en la unión al receptor (8) (Figura 2).

Las proteínas STAT poseen un dominio SH2 (*SRC homology*) conservado que participa en el anclaje de las STAT al receptor y en la formación de dímeros, una tirosina cuya fosforilación permite la oligomerización, y una región amino terminal que participa en la formación de dímeros. El dominio SH2 es un elemento común entre las moléculas de señalización que median las interacciones proteína-proteína por unión directa a enzimas fosfotirosinas. El extremo C-terminal de las proteínas STAT posee elementos claves para su activación y correcto funcionamiento, como por ejemplo el dominio de transactivación necesario para su actividad transcripcional. En el extremo N-terminal las proteínas STAT poseen el dominio de unión al ADN y una región que media la oligomerización de los dímeros que entran al núcleo (Figura 2). Existe, además, una serina susceptible de fosforilación (8, 11).


Figura 2. Esquema de la estructura de las proteínas JAK y STAT (tomado de (8)).

La vía JAK/STAT es una ruta metabólica muy conservada desde el punto de vista evolutivo y es un modelo idóneo para la comprensión de la comunicación celular y el papel de la señalización membrana – núcleo en el control de la expresión génica (9).

A pesar de que el modelo canónico de la ruta JAK/STAT es simple y directo, existe regulación por parte de otras rutas de señalización, incluyendo a ERK (*Extracellular Regulated Kinases*) - MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*), PI-3K (*Phosphatidyl Inositol-4,5-biphosphate 3-Kinase*) y otras (Figura 3). Además, las actividades no canónicas propias de la ruta influyen en el estado transcripcional global mediante modificaciones en la estructura de la cromatina (7).



**Figura 3.** Regulación de rutas de señalización relacionadas con la ruta JAK/STAT (tomado de (7)).

Las diferentes células y tejidos expresan distintas combinaciones de receptores que responden a distintas citoquinas según su microambiente. Así, una célula individual incorpora señales provenientes de varios receptores de citoquinas. Experimentos de microarray diseñados para estudiar cambios en la expresión génica inducidos por la vía JAK/STAT han revelado que el tipo de célula y el perfil de ARN mensajero influyen en dicha expresión según el tipo de receptor de citoquina activado (12).

Las proteínas STAT activan un determinado conjunto de genes, dependiendo de su accesibilidad y de distintos cofactores que mejoran el perfil de expresión de los mismos. Se ha visto que la mayoría de citoquinas son capaces de activar varios STAT, remarcando la necesidad de determinar cuál es la respuesta transcripcional alternativa que se activa en ausencia de un STAT determinado. Usando células deficientes en un receptor determinado o deficientes en la STAT dominante en el tipo celular en cuestión, se observa un intercambio del papel protagonista entre un STAT y otro alternativo. Sin embargo, puede existir cierta preferencia por un STAT frente a otro, así como una tendencia a unir un solo tipo de STAT y en su ausencia, no poder ser activado ningún otro tipo (12).

Los avances en el estudio del genoma nos han brindado la oportunidad de conocer nuevos aspectos sobre la biología de las proteínas STAT, como la naturaleza ubicua de su unión a secuencias diana. Si bien todos los STAT son capaces de reconocer la misma secuencia en el ADN (elemento GAS (*Gamma interferon activation site*)), existe cierta selectividad variable entre las diferentes proteínas y funciones no redundantes entre las mismas, aunque una misma secuencia puede ser reconocida por distintas STAT (9). Una idea asumida es que las proteínas STAT sólo son activas en el núcleo. Sin embargo, en estudios recientes se ha visto que STAT3 puede localizarse en la mitocondria. Allí promueve la fosforilación oxidativa y la permeabilidad de la membrana, como consecuencia de la fosforilación en serina y en situaciones donde la respiración celular se vea alterada, como en el estrés celular y en cáncer (9).

A diferencia de las rutas de señalización activadas por los receptores de citoquinas, que utilizan quinasas como JAK para fosforilar a las STAT, los receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa intrínseca, como los receptores de EGF (*Epidermal Growth Factor*) y PDGF (*Platelet Derivated Groth Factor*), pueden fosforilar a las proteínas STAT

directamente, sin intermediarios. Además, existen quinasas solubles independientes de receptores, como Src (*non-receptor tyrosine kinase*) y Abl (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog*), que también las fosforilan directamente. Así, dependiendo del receptor concreto del que se trate y del contexto celular, distintas tirosina quinasas participan en la activación de la ruta de señalización dependiente de STAT (11).

#### 2.2. Regulación negativa de la ruta

La señalización activada por citoquinas suele ser temporal. Normalmente la activación de STAT ocurre de manera rápida tras la estimulación con citoquina y va disminuyendo en las siguientes horas. Cabe destacar al respecto que se han descrito distintos niveles de regulación negativa (13). De esta forma, al menos tres tipos de inhibidores, las proteínas tirosina fosfatasas como SHP-1 (*Src-homology 2 domain (SH2)-containing phosphatase*) y CD45, (*cluster of differentiation*) las proteínas PIAS (*Proteins Inhibitor of Activated STAT*) y las SOCS (*Suppressors of Cytokine Signalling*), contribuyen a la regulación negativa de la señalización de citoquinas, y concretamente de la ruta que nos ocupa. Entre estos inhibidores, la familia SOCS incluye los reguladores negativos inducibles más frecuentes e importantes en la estimulación por citoquinas (14). A continuación se hablará más detenidamente de cada uno de estos reguladores negativos:

*Fosfatasas*. Tres familias de proteínas tirosina fosfatasas están implicadas en la regulación negativa de la ruta de señalización JAK/STAT. La primera familia en ser descrita fue la de las tirosina fosfatasas que contienen el dominio SH2, que incluye a las proteínas SHP1 y SHP2. Su acción asegura que la fosforilación de la tirosina en el receptor de citoquina y en la proteína JAK no se mantenga una vez eliminada la citoquina. También se ha descrito que tras la estimulación con la GH (*Growth Hormone*), SHP1 migra al núcleo, donde se une a STAT5b inhibiendo su actividad (15). El

segundo tipo de tirosina fosfatasa identificado que afecta negativamente a la ruta JAK/STAT es la tirosina fosfatasa transmembrana CD45. Ambos tipos de fosfatasas (SHP-1/2 y CD45) no se asocian directamente al dominio quinasa de JAK, lo que sugiere que serían otras fosfatasas las que desactivarían a JAK. Incluidas en la tercera familia de fosfatasas mencionadas anteriormente, están las fosfatasas de tirosina PTP1B (*protein-tyrosine phosphatase 1B*) y TC-PTP (*T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase*), que presentan grandes similitudes en sus dominios catalíticos pero muestran cierta especificidad hacia las distintas JAK. PTP1B interacciona con JAK2 y TYK2 mientras que TC-PTP interacciona con JAK1 y JAK3, provocando su desfosforilación y consecuente inactivación (16).

*PIAS.* Se trata de una familia de proteínas formada por cuatro miembros: PIAS1, PIAS3, PIASx y PIASy. PIAS3 interacciona con STAT3; PIASx con STAT4; PIAS1 y PIASy, con STAT1. Estas interacciones regulan negativamente la actividad de STAT. Se ha sugerido que PIAS1 y PIAS3 actúan bloqueando la unión al ADN de STAT1 y STAT3, respectivamente. Por el contrario, PIASx y PIASy reprimen la actividad transcripcional de STAT1 y STAT4 mediante el reclutamiento de moléculas co-supresoras como las HDAC (*histone deacetylases*) (16).

SOCS: Esta familia de proteínas representa un punto de control negativo fundamental de la ruta JAK/STAT. Hay ocho miembros en la familia de estas proteínas, CIS (*Cytokine Inducible SH2 Containing Protein*) y SOCS1-7, caracterizadas todas por una alta conservación en el extremos C-terminal del motivo caja SOCS, responsable a su vez de la formación del complejo E3 ubiquitina ligasa. Estas proteínas también contienen un dominio central SH2 y una extensión  $\alpha$ -helicoidal adyacente, denominada ESS (*Extended SH2subdomain*), que se une a tirosinas fosforiladas en las proteínas diana. Las proteínas SOCS también albergan una región N-terminal que varía en secuencia y longitud en toda la familia, y que en SOCS1 y SOCS3 incluye una región KIR (*Kinase Inhibitory Region*) (Figura 4) (17).



Figura 4. Esquema de la estructura de las proteínas SOCS (tomado de (17)).

Las proteínas SOCS son capaces de inhibir la señalización por citoquinas mediante la inhibición de la actividad de JAK, compitiendo con STAT por los sitios de unión fosforilados de los receptores o dirigiendo las proteínas de señalización dianas a la vía del proteosoma tras su ubiquitinación a través de la caja SOCS (16). Las E3 ubiquitina ligasas median la fijación de la ubiquitina a un residuo de lisina en el sustrato de la enzima. De esta forma, está descrito que SOCS2 es parte de un complejo E3 ubiquitina ligasa con un papel clave en la regulación negativa de la vía de señalización GHR (*Growth Hormone Receptor*)-JAK2-STAT5b, actuando en un circuito clásico de retroalimentación negativa. La transcripción de SOCS2 es inducida por STAT5b en respuesta a la estimulación por parte de la GH. SOCS2 se une a las tirosinas fosforiladas en el dominio citosólico de GHR a través de su dominio SH2, mientras recluta Elongin B y C, la proteína de andamio Cullin5 y la proteína de anillo Rbx2, a través de su dominio de caja SOCS para ensamblar un complejo de ubiquitina ligasa E3 que ubiquitina el

GHR y promueve su internalización. Estos endosomas tempranos que contienen el GHR se fusionan posteriormente a los lisosomas donde se procede a su degradación (15). Como la expresión de los genes que codifican para las proteínas SOCS dependen de la señalización por citoquinas, las proteínas SOCS participan en un círculo de retroalimentación negativa (13).

La expresión anormal de SOCS regula el desarrollo de tumores en varios tipos celulares. Se sabe que SOCS1 y SOCS3 juegan un papel clave en el desarrollo de diversos tipos de cáncer. SOCS1 muestra un efecto antitumoral en la mayoría de los tumores a través de la inhibición de la proliferación tumoral, la atenuación de la invasión tumoral y la reducción de la sensibilidad de las células tumorales a las citoquinas u hormonas. SOCS3 puede actuar como un oncogén o como un supresor tumoral, dependiendo del contexto celular. Además, SOCS3 es frecuentemente silenciado en cáncer, lo que conduce a una ventaja de crecimiento para las células cancerosas (14).

A pesar de todo lo que se sabe sobre estas proteínas, todavía quedan muchas preguntas sobre la función precisa de las proteínas SOCS, y aún no se tienen detalles completos sobre cómo actúan mecánicamente para inhibir la señalización. Como ocurre con muchas proteínas de señalización, la función de cualquier proteína SOCS particular está intrínsecamente ligada a las proteínas con las que interactúa y a los complejos que forma en el contexto biológico concreto. Aparte de SOCS6 y SOCS7, no se conoce ningún dato definitivo que sugiera redundancia funcional entre los miembros de la familia SOCS. Aunque las proteínas SOCS a menudo se dirigen a vías similares, su función específica *in vivo* parece ser única. Esto es probablemente debido en parte a la magnitud o el momento de la inducción, o a la expresión diferencial en tipos de células distintas. También puede haber diferentes afinidades por las dianas o diferencias en la localización subcelular que impiden la redundancia (17).

#### 2.3. Su importancia en cáncer y otras patologías

La hiperactivación de la ruta JAK/STAT se asocia a muchos trastornos autoinmunes y con diversos tipos de cáncer (18-23). Además, mutaciones que alteran el funcionamiento de las STAT se relacionan con distintos agentes patógenos. Por todo ello, la regulación de esta ruta de señalización debe de ser precisa.

La hiperactivación de la ruta JAK/STAT, concretamente cuando implica a STAT3 y/o STAT5, se considera actualmente como una característica propia de la mayoría de los tumores sólidos y cánceres sanguíneos (19, 23, 24). Además, mutaciones somáticas en las proteínas JAK, muchas de las cuales ocurren en el dominio pseudoquinasa, son propias de lesiones oncogénicas. El punto de referencia fue el descubrimiento de ganancia de función por parte de JAK, responsable del desarrollo de diferentes tipos de leucemias y trastornos mieloproliferativos (7, 9). Por ejemplo, se ha descrito una mutación en el dominio pseudokinasa JH2 del gen JAK2 (JAK2 V617F) que produce una activación constitutiva de la vía de señalización JAK/STAT y que está presente en diversos cánceres hematológicos, como por ejemplo en pacientes con AML (Acute Myeloid Leukemia) con antecedentes de MPD (Myeloproliferative Disorders) o de MDS (Myelodysplastic Syndromes), y HEL (Human Erythroleukemia) sin historial de MPD o MDS (25). Además, otras mutaciones en las proteínas JAK se asocian a otros muchos trastornos, como por ejemplo, deficiencias en el sistema immune y el síndrome de hyper IgE (revisado en (7)).

Otro trastorno hematológico, en este caso de células madre, en el que existe una activación aberrante de la ruta JAK/STAT, producida por la oncoquinasa de fusión Bcr-Abl, es la leucemia mieloide cróncica CML (*Chronic Myelogenous Leukemia*). El sello distintivo de la CML es el cromosoma Filadelfía, que surge de la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22, resultando en una proteína de fusión Bcr-Abl, una tirosina quinasa constitutivamente activa. Bcr-Abl es capaz de activar diversas vías de transducción de señales intracelulares, entre ellas STAT5, promoviendo la proliferación y la inestabilidad genética, la supresión de la apoptosis y el debilitamiento de la adhesión celular (26).

Diversos estudios han demostrado que Bcr-Abl inhibe la apoptosis en células CML a través de la expresión y/o activación de miembros de la familia de proteínas moduladoras de la apoptosis Bcl-2 (27-29). Particularmente relevantes en la leucemia son la proteína proapoptótica Bax, la proteína antiapoptótica Bcl-xL, (que previene la liberación citoplasmática del citocromo C, el cual está implicado en la activación de la ruta intrínseca de la apoptosis), y la proteína antiapoptótica Mcl-1 (capaz de unirse a caspasas para inhibir la señalización apoptótica). Curiosamente, se ha demostrado que la inhibición de Bcr-Abl/STAT5 induce la apoptosis en células CML suprimiendo la regulación transcripcional dependiente de STAT5, de miembros de la familia Bcl-2 tales como Mcl-1(27) y Bcl-xL (29).

Por otro lado, se ha observado que la alteración de los niveles de expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular es común en distintos tumores, y que esta alteración puede estar mediada por las proteínas STAT. La expresión de ciclina D1, que se asocia con CDK4 (*Cyclin-Dependent Kinase 4*) y CDK6 (*Cyclin-Dependent Kinase 6*) y que controla el paso de la fase G1 del ciclo a la fase S, se encuentra incrementada en células que expresan STAT3 constitutivamente activo. Además, diferentes estudios donde se analizan las consecuencias de la activación constitutiva de STAT3 (STAT3-C), han demostrado la correlación que existe entre los niveles elevados de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Bcl-xL, Mcl-1) y el cáncer (11).

En general, la hipótesis por la que se relaciona la activación constitutiva de las proteínas STAT y la evolución de diversos tipos de tumores se apoya en cuatro hallazgos claves: 1) las proteínas STAT son selectivamente activadas por rutas de señalización que implican a enzimas tirosina quinasas; 2) las STAT mutadas bloquean la transcripción y la transformación inducida por tirosina quinasas; 3) las STAT constitutivamente activas inducen ciertos aspectos propios de la transformación celular; y 4) la activación anormal de las proteínas STAT en la oncogénesis conlleva la expresión de genes involucrados en el control de la proliferación y supervivencia celulares (11).

A nivel de los reguladores negativos de la ruta JAK/STAT, existen algunas modificaciones en los mismos que se traducen en una desregulación y, consecuentemente, en el desarrollo de diferentes patologías. De esta forma, la desregulación epigenética (por ejemplo, por metilación) de los genes de la familia SOCS ocurre con frecuencia en el cáncer y causa el silenciamiento del gen en un número relativamente grande de células tumorales. El estado de metilación de los genes SOCS varía en diferentes tipos de tumores (14). Por ejemplo, se ha observado que el silenciamiento del gen SOCS1 se asocia con el desarrollo del carcinoma hepatocelular. Además, también se ha descrito que la inhibición de la expresión de SOCS3 por metilación también está asociada al carcinoma hepatocelular. La no expresión de SOCS3 le confiere a la célula ventajas en el crecimiento y en la migración, favoreciendo la ruta de señalización JAK/STAT, entre otras. La metilación en SOCS-3 también se ha observado frecuentemente en células escamosas de carcinoma de cabeza y cuello (16).

# 2.4. La ruta de señalización JAK/STAT como diana antitumoral

Se ha demostrado que las proteínas JAK juegan un papel crítico en prácticamente todas las señales dependientes de STAT. Por lo tanto, para

bloquear la señalización inducida por citoquinas, las proteínas JAK constituyen una diana atractiva para el desarrollo de inhibidores en situaciones en las que se produce una señalización inadecuada o excesiva (30).

Tal como se ha comentado anteriormente, la vía de señalización JAK/STAT se caracteriza por interacciones macromoleculares (proteína - proteína y proteína - ADN), algunas constitutivas y otras inducibles. La mayoría de estas interacciones incluyen la unión de citoquinas al receptor, la agregación del receptor y su cambio conformacional, la unión de los JAK a la cara citoplasmática del receptor, el reclutamiento de STAT al receptor activado, la dimerización de STAT, la unión de STAT al ADN, interacciones entre dímeros y la asociación de STAT con otros factores de transcripción y coactivadores transcripcionales. Varias de estas interacciones representan puntos de especificidad en la cascada de señalización, convirtiéndolos en sitios potencialmente atractivos para intervenir farmacológicamente (30).

La mayoría de los inhibidores de JAK que están actualmente en desarrollo clínico son moléculas de pequeño peso molecular que compiten por el sitio de unión al ATP de la quinasa. Estos inhibidores se clasifican según su especificidad hacia JAK2 con respecto a otros miembros de la familia JAK. De esta forma, aquellos que inhiben preferentemente JAK2 se clasifican como específicos (clase I) y aquellos que inhiben a otros miembros de la familia se clasifican como no específicos (clase II) (31).

El primer inhibidor de JAK fiable descrito fue la piridona 6, (32) un compuesto que demostró poseer actividad inhibidora en el rango nanomolar en ensayos bioquímicos contra todos los miembros de la familia JAK. Aunque la piridona 6 se ha utilizado ampliamente para explorar el efecto de la inhibición de JAK *in vitro*, su pobre perfil farmacocinético impide su uso *in vivo* en animales. La estructura cristalina reveló que la piridona 6 se une al

bolsillo de ATP del dominio quinasa JH1 de la conformación activa (fosforilada) de JAK2. La mayoría de los inhibidores de JAK desarrollados posteriormente también se unen al dominio JH1 en esta conformación (33).

Varios inhibidores de JAK2 han sido probados en ensayos clínicos en pacientes con MF (*myelofibrosis*) de riesgo intermedio o alto. El ruxolitinib inhibe con gran potencia la fosforilación de JAK1, JAK2, JAK2V617F, STAT5 y ERK1/2 *in vitro*, y fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos para tratar la mielofibrosis de riesgo intermedio y alto en Noviembre de 2011 (34). Otro producto denominado SAR302503 (anteriormente TG101348) (35) inhibe JAK2 y JAK2V617F preferentemente (con una IC50 <50 nM), sobre otros miembros de la familia de proteína quinasas JAK, y a sólo otras dos quinasas (FLT3 y RET) entre las 223 quinasas analizadas. Por otro lado, el pacritinib es un inhibidor selectivo de JAK2 que ha sido probado en un estudio de fase II en el que participaron 34 pacientes con mielofibrosis (36). Otros inhibidores específicos de JAK2 en fase de ensayos clínicos son el INCB018424 y el XL019. Sin embargo, los beneficios clínicos de XL019 sólo se observaron en pacientes con mutaciones en JAK2 (31).

En general, un inconveniente de los inhibidores de proteína quinasas utilizados actualmente es la falta de selectividad, lo que implica que las dosis tolerables se encuentran dentro de un rango pequeño debido a la inhibición colateral de otros miembros de la familia de proteínas JAK y de otras quinasas. El desarrollo de inhibidores específicos para cada una de las cuatro quinasas JAK, podría resolver parcialmente este inconveniente, pero éste es un objetivo difícil de lograr debido a que el sitio activo de las distintas proteínas JAK es muy similar (37).

Los inhibidores de proteína quinasas se pueden clasificar también según su sitio de acción en la estructura de la proteína. Así, por ejemplo, el ruxolitinib (y otros inhibidores de JAK bajo evaluación clínica) se encuentra dentro de la denominada familia de inhibidores de JAK de tipo I, siendo su diana el bien conservado bolsillo de unión al ATP de JAK1 y JAK2, tanto en la conformación activa como inactiva. Por el contrario, los inhibidores de tipo II (como por ejemplo, el imatinib (IM)), comentado más adelante), estabilizan específicamente a las proteína quinasas en conformación inactiva, aprovechando un sitio alostérico adicional, menos conservado y directamente advacente a la bolsa de unión al ATP. Este mecanismo podría otorgar una alternativa para ajustar la selectividad. Recientemente, se ha encontrado una nueva clase de inhibidores que se une al dominio pseudoquinasa de TYK2 y lo bloquea en una conformación que estabiliza la interacción auto-inhibitoria con el dominio quinasa adyacente, impidiendo su activación mediada por receptor. Paradójicamente, el aumento de la especificidad en estos inhibidores podría resultar en una disminución en el beneficio clínico general debido a la pérdida de la inhibición colateral de los procesos inflamatorios relacionados con el cáncer (37).

Los STAT, y muy en particular STAT3/5, son considerados dianas terapéuticas de gran interés para el desarrollo de fármacos antitumorales más eficaces y con mejor índice terapéutico. Como ya se ha dicho, las proteínas STAT contienen un dominio SH2 y un dominio de unión al ADN, y estos dominios son responsables de las funciones bioquímicas conocidas más importantes de las mismas. Dado su papel crítico en la función de STAT, ambos dominios son objetivos atractivos para el descubrimiento de fármacos (30). Como consecuencia, se están empleando muchos esfuerzos para identificar y validar mecanismos y estrategias que permitan interferir de forma directa o indirecta con la actividades intracelulares aberrantes de estas proteínas. Esto ha generado, hasta ahora, un número moderado de patentes, incluída la de nuestro grupo, basadas, entre otros, en los siguientes tipos de moléculas inhibidoras de la actividades de STAT: A) moléculas péptidicas o peptidomiméticas análogas a los dominios SH2 de STAT3 que interfieren

con su dimerización y que resultan eficaces para inhibir la proliferación de células tumorales en el rango micromolar (38-40). Son una opción atractiva, ya que podrían interrumpir la activación de STAT a través de dos mecanismos: la prevención del reclutamiento de STAT en el complejo receptor y la prevención de la dimerización (41). B) Moléculas de bajo peso molecular diseñadas siguiendo estrategias de *docking* molecular in silico y/o diseño racional basado en estructuras privilegiadas. Entre estas, incluída la patentada por nuestro grupo (42), podemos encontrar diferentes moléculas inhibidoras de STAT3/5 con actividad antitumoral in vivo en el rango submicromolar (42-45). C) Oligonucleótidos sintéticos específicos que inhiben la interacción de STAT al ADN bloqueando su actividad transcripcional y eficacia antitumoral en el rango micromolar (46, 47). Si esta molécula señuelo está presente en concentraciones suficientes dentro de una célula, podría unirse a las STAT activadas antes de que éstas se unan a los elementos promotores de los genes diana. Esto evitaría la activación de genes cuya expresión dependa de STAT y proporcionaría potenciales efectos terapéuticos en situaciones en las que exista una activación aberrante de estos factores de transcripción (41).

La activación constitutiva de STAT3 y la evidencia de su implicación en la carcinogénesis, ha convertido a STAT3 en una opción como diana terapéutica en tumores sólidos. En los últimos años se han empleado varias estrategias para la inhibición de STAT3, incluyendo la inhibición de su dimerización mediada por el dominio SH2, de su función de unión al ADN y de la interacción proteína - proteína a través de su dominio N-terminal (31). La obtención de moléculas de bajo peso molecular que sean capaces de atravesar la membrana plasmática, podría representar una opción más viable para inhibir la dimerización de STAT3. Gracias al modelado computacional del dominio SH2 de STAT3 (modelización *in silico*) se han podido identificar algunos nuevos candidatos. Uno de ellos, el fármaco STA-21, inhibe la actividad de unión de STAT3 al ADN y suprime el crecimiento celular en las líneas celulares de carcinoma de mama humano y de rabdomiosarcoma (31).

El dominio N-terminal de STAT3 contiene 130 aminoácidos y ocho hélices, que median las interacciones proteína - proteína entre los dímeros STAT3 y la maquinaria transcripcional ensamblada. Existen evidencias que demuestran que un grupo de péptidos cortos derivados del dominio Nterminal interactúan específicamente con STAT3, pero no con otros miembros STAT. Estos péptidos inhiben la actividad transcripcional de STAT3 sin afectar a su estado de fosforilación (31).

Cabe destacar llegados a este punto que a pesar de los resultados preclínicos descritos anteriormente, ningún fármaco inhibidor de STAT3 parece estar listo para el desarrollo clínico (31).

Por otro lado, STAT5 juega un papel clave en el desarrollo de diversos trastornos hematopoyéticos y neoplasias malignas (48). La mutación en el dominio de la pseudoquinasa JH2 del gen JAK2 (JAK2 V617F) en MPD crónicos, comentada anteriormente, promueve la activación constitutiva de STAT5 en este tipo de patologías (49). Como ya se ha comentado, la oncoproteína Bcr-Abl, propia de CML, promueve el desarrollo de la leucemia activando múltiples vías de señalización, incluida JAK2/STAT5, que regulan la proliferación celular, la transformación y la supervivencia. El tratamiento de las enfermedades inducidas por Bcr-Abl mejoró significativamente tras el desarrollo de inhibidores de bajo peso molecular que bloquean la actividad de la quinasa Abl. El IM (50) fue el primer compuesto descrito para inhibir Bcr-Abl, seguido de otros TKI (Tyrosine Kinase Inhibitors), como dasatinib y nilotinib. El IM es la terapia de primera línea estándar para los pacientes con CML. Sin embargo, no todos los pacientes responden de la misma manera al tratamiento y aproximadamente del 15% al 25% que inicialmente respondieron bien, adquirieron resistencia frente al IM durante el tratamiento. (51).

Las vías de señalización activadas por Bcr-Abl incluyen la vía PI3KmTOR (*mammalian target of rapamycin*), la vía RAS/RAF/MEK/ERK y la vía JAK/STAT. Las proteínas JAK2 y STAT5 están constitutivamente activadas en células de pacientes con CML. Aunque la señalización JAK-STAT normalmente es activada por citoquinas, la activación de JAK2 y STAT5 en células Bcr-Abl positivas depende de la actividad de la proteína quinasa Abl. Se sabe de esta dependencia porque el tratamiento con IM elimina completamente la fosforilación de JAK2 y STAT5 y el tratamiento de estas células con inhibidores de JAK2 o la deleción de STAT5 induce apoptosis, incluso en las células resistentes a IM, poniendo de manifiesto el papel central de JAK2/STAT5 en la maquinaria de señalización para la supervivencia de CML (48).

Por todo lo comentado anteriormente y debido a la implicación de la ruta JAK/STAT en procesos tan importantes relacionados con el desarrollo de trastornos autoinmunes y cáncer, no sorprende el atractivo que supone sobre todo JAK (y otras tirosina quinasas) como diana terapéutica (9).

# 2.5. Resistencia a fármacos antitumorales: necesidad de búsqueda de sinergias

De manera similar a lo que ocurre con la mayoría de los inhibidores de quinasas, la eficacia a largo plazo de los inhibidores de JAK es un desafío debido a la aparición de la resistencia adquirida a los fármacos. Un ejemplo de mecanismo para la adquisición de resistencia es el de los transportadores de eflujo de fármacos que se unen al ATP, que reducen eficazmente la acumulación del inhibidor de JAK CYT387 en el cerebro, sugiriendo un papel para estos transportadores en el control de la distribución de fármacos a

través de la barrera hematoencefálica. Como los transportadores de eflujo se expresan en una amplia gama de tejidos tales como el intestino y el hígado, también pueden mediar la resistencia a los inhibidores de JAK en estos órganos (33). Por otro lado, la resistencia a los inhibidores de JAK también podría ser producida por un aumento en la expresión de las quinasas JAK o la inactivación genética (epigenética) de SOCS y otros reguladores negativos de esta ruta de señalización. Sin embargo, los mecanismos concretos de adquisición de resistencia siguen siendo desconocidos, aunque ambos mecanismos se observan en algunos cánceres sólidos (33).

En pacientes con MPN (*Myeloproliferative Neoplasm*), se ha visto que la resistencia a la terapia con inhibidores de JAK2 no está mediada por mutaciones secundarias en la quinasa JAK2V617F. Más bien, es la consecuencia de la reactivación de la vía JAK/STAT a través de la heterodimerización de JAK2 y JAK1 o TYK2 activado, lo que promueve la resistencia a la apoptosis inducida por inhibidores de JAK2 (36).

Como ya se ha comentado anteriormente, los trastornos de MPN son consecuencia de la activación constitutiva de JAK2 corriente arriba de las cascadas de señalización interconectadas (STAT3/5, PI3K /Akt (*protein kinase B*)/mTOR, MAPK), que actúan sinérgicamente sobre la proliferación celular. Así, la intervención simultánea en ambos brazos de las cascadas de señalización JAK/STAT y PI3K parece ser una opción razonable para la intervención terapéutica. El ruxolitinib, con eficacia demostrada en pacientes con MF, tal como se ha comentado anteriormente, presenta tasas de fracaso en algunos pacientes. Este fracaso del tratamiento se manifiesta como refractariedad primaria (respuesta clínica mínima o nula) o resistencia secundaria (pérdida de una respuesta clínica previamente confirmada) (37). Se ha demostrado que la combinación de ruxolitinib con un inhibidor de PI3K inhibe sinérgicamente la proliferación de modelos de células MPN *in vitro*, reduciendo además el peso del bazo en los modelos preclínicos de

MPN. Además, el bloqueo simultáneo de la señalización oncogénica a múltiples niveles mediante enfoques terapéuticos combinados (tales como ruxolinitib con inhibidores de PI3K o inhibidores de HSP90 *(Heat Shock Protein 90 kDa)*) podría evitar la aparición de resistencia distribuyendo la presión selectiva entre objetivos distintos. Así, es muy probable que los inhibidores de JAK combinados con otras terapias dirigidas sean más eficientes en la modificación sinérgica de la historia natural de la enfermedad, superando la persistencia del inhibidor y previniendo la aparición de subclones resistentes (37). Por tanto, la búsqueda de sinergia con otros fármacos se presenta como una opción válida para intentar superar la resistencia a los inhibidores de JAK.

Se sabe que JAK y otras tirosina quinasas requieren proteínas *chaperonas* para mantenerse en una conformación funcionalmente activa, y la interferencia con este proceso da como resultado una actividad quinasa reducida (33). En este sentido, la combinación de panobinoSTAT, que se sabe que inhibe la función chaperona de HSP90 y promueve la degradación proteasomal de JAK2V617F, con el inhibidor de JAK2 TG101209, induce de manera sinérgica la apoptosis de células HEL (JAK2V617F+) y Ba/F3-JAK2V617F, y ejerce una mayor citotoxicidad en células de MPN CD34+ frente a células progenitoras hematopoyéticas CD34+ normales (52).

Queda por determinar si el sinergismo observado *in vitro* entre los inhibidores de JAK2 y otros agentes terapéuticos se traducirá en estrategias terapéuticas eficaces en pacientes que exhiben resistencia al tratamiento con inhibidores de JAK2 y si el paradigma del tratamiento de la inhibición de JAK2 puede extenderse con éxito a otras neoplasias hematológicas o no hematológicas, con una regulación alterada de la vía JAK/STAT (36).

El uso del IM (STI571) para inhibir la tirosina quinasa Bcr-Abl en CML fue la primera confirmación de que los inhibidores de quinasas son eficientes en el tratamiento del cáncer (53). Sin embargo, el éxito inicial del IM, así como el de otros inhibidores de tirosina quinasa en el tratamiento del cáncer, se ve limitado por el desarrollo de resistencia a los mismos por parte de las células tumorales (54-56). El IM interactúa cerca del sitio de unión al ATP de la quinasa Abl. Después del éxito en los ensayos *in vitro*, se observó que seis de nueve pacientes con CML que presentaban resistencia a IM, poseían una sustitución de un solo nucleótido en el gen Abl, dando como resultado una sustitución de treonina a isoleucina en el aminoácido 315 (Th315-Ile315; T315I). Si bien las mutaciones en Bcr-Abl pueden ser el origen del desarrollo de resistencias al IM (o en otras proteína quinasas para otros fármacos), también pueden darse otros mecanismos o circunstancias que tengan como consecuencia la adquisición de resistencia: duplicación de Bcr-Abl, entrada/salida del fármaco, la concentración del fármaco en cuestión, la activación de rutas de señalización alternativas o la modificación epigenética (57).

En lo que se refiere a la CML, cabe destacar que el papel de STAT5 no se limita sólo a su influencia en la patogenia de este cáncer hematológico, sino que también actúa como un importante modulador en la respuesta a la terapia con inhibidores de proteína quinasa de las células que expresan Bcr-Abl. Así, mientras que niveles reducidos de proteína STAT5 se asocian con una mayor sensibilidad de las células BCR-ABL+ al IM *in vitro*, la sobre-expresión de STAT5 conduce a una reducción de la citotoxicidad inducida por el fármaco. La expresión de mRNA de STAT5 así como los niveles de la proteína, son más elevados en fases avanzadas de CML y en muestras de pacientes que han desarrollado resistencia a TKI. La aparición de esta resistencia al IM es dependiente de la actividad transcripcional de STAT5 y puede estar mediada por la expresión aumentada de los genes antiapoptóticos cuya expresión depende de STAT5, como por ejemplo BclXL y Bcl-2, evitando así la apoptosis y la citotoxicidad. Además, existe una correlación entre niveles elevados de STAT5 fosforilado y la resistencia al IM (51).

Para revertir esta resistencia al IM y a otros TKI nuevamente parece apropiada la estrategia de búsqueda de sinergia con otros fármacos con una diana diferente (58). De esta forma, la importancia de STAT5 en la patogenia de CML, convierte a esta proteína en una diana muy atractiva. En este sentido, el fármaco neuroléptico denominado pimozida (antagonista de los receptores centrales dopaminérgicos), es un compuesto que además parece inhibir específicamente la fosforilación de STAT5 en células de CML. Este efecto se ve realzado cuando actúa en sinergia con los TKIs IM y nilotinib. Además, parece que la pimozida no funciona como un inhibidor de proteína quinasa, ya que ni disminuye la autofosforilación de Bcr-Abl ni la fosforilación en tirosina de otras proteínas mediadas por esta quinasa. La eficacia de la pimozida y sus efectos beneficiosos en CML en combinación con otros inhibidores de tirosina quinasa como el IM sugieren que la estrategia de inhibir directamente a proteínas STAT y otros factores de transcripción oncogénicos, así como la búsqueda de sinergias para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer puede ser altamente beneficiosa (58).

### 3. Desarrollo de nuevos fármacos

# **3.1.** Los productos naturales como fuente de nuevos fármacos y estrategias de cribado de librerías de productos

Para la búsqueda de nuevas moléculas con posible actividad biológica teóricamente se dispone de todo el espacio químico, que se estima está formado por más de  $10^{63}$  moléculas orgánicas de peso molecular inferior a 500 Da y con propiedades adecuadas para convertirse en fármacos (59). Sin embargo, solo una baja proporción de estos compuestos serán buenos candidatos para fines biomédicos. Para acceder a moléculas que ocupen regiones biológicamente relevantes de ese espacio químico, los productos naturales constituyen moléculas de referencia, ya que el espacio químico definido por ellos se superpone al biológico, debido principalmente a que

estos se consideran estructuras químicas que ya han sido biológicamente validadas (60).

Aproximadamente el 60% de los agentes anticancerígenos y el 75% de los antibióticos del mercado farmacéutico son derivados de productos naturales (61). Los motivos estructurales y esqueletos base presentes en los productos naturales bioactivos pueden servir como guías o *"chemical navigators"* en la síntesis de nuevas moléculas que ocupen regiones inexploradas del espacio químico biológicamente relevante (62).

Basado en esta idea se han desarrollado algunas estrategias sintéticas. Entre estas estrategias podemos citar la Síntesis Orientada Biológicamente (BIOS) (63), en la que utilizan la información estructural presente en los productos naturales y en los dominios de proteínas, para diseñar quimiotecas con un alto contenido de moléculas bioactivas. La Síntesis Orientada a la Diversidad (SOD) (64, 65) tiene como objetivo la preparación de una amplia distribución de compuestos con diversas estructuras en el espacio químico, incluyendo las zonas poco pobladas o vacías de ese espacio, y que permitan mejores correlaciones empíricas con las propiedades deseadas. Se pretende obtener diversidad en los sustituyentes, diversidad de esqueletos y diversidad estereoquímica de manera análoga a la naturaleza. Basados en los conceptos de estructura privilegiadas y de síntesis orientada a la diversidad (SOD) ha surgido la aproximación Síntesis Orientada a la Diversidad basada en estructura privilegiada (p-SOD) (66). Esta estrategia plantea la construcción de esqueletos rígidos poliheterocíclicos embebidos con estructuras privilegiadas, en lugar de compuestos lineales flexibles, aumentándose la probabilidad de identificación de nuevos agentes terapéuticos o pequeñas moléculas moduladoras que muestren mayor selectividad hacia diversas dianas biológicas.

Algo a tener en cuenta basándose en las estructuras y las funciones de los productos naturales es que la complejidad estructural se correlaciona con la capacidad de alterar a las proteínas y con la especificidad de acción. Por consiguiente, para lograr complejidad en los esqueletos mediante BIOS, SOD y p-SOD, es importante identificar e implementar reacciones generadoras de complejidad, y que de forma rápida unan esqueletos moleculares sencillos para formar productos complejos. En este sentido, las reacciones dominó y multicomponentes constituyen una herramienta para la síntesis de moléculas complejas similares a los productos naturales con diversidad estructural (67, 68).

Una reacción dominó se define como un proceso en el que se forman dos o más enlaces en una sola secuencia (involucrando varias transformaciones), sin aislar intermedios, cambiar condiciones de reacción o añadir reactivos adicionales (69). Las reacciones multicomponentes (RMCs) son procesos "one-pot" que emplean más de dos reactivos, y donde la mayoría de los átomos de los reactivos son incorporados al producto final (70, 71). Como no se requiere el aislamiento de intermedios de reacción, y se consigue complejidad y diversidad estructural a partir de sustratos sencillos con ahorro económico y con un impacto mínimo sobre el medio ambiente, las RMCs son una poderosa herramienta para el descubrimiento de nuevos candidatos a fármacos (72). Generalmente, las RMCs son procesos dominó, pero también existen reacciones multicomponente que deben ser llevadas a cabo de manera secuencial, o donde el orden de adición de los reactivos juega un papel esencial, para la obtención óptima del producto final. Esta técnica es conocida como MCAP (*Multicomponent Assembly Process*) (73).

Si se dispone de una buena cantidad de un producto natural se puede generar directamente una quimioteca de análogos a partir del mismo mediante transformaciones directas sobre los distintos grupos funcionales, lo que ayudaría a establecer estudios de relación estructura-actividad y por consiguiente la quimiomodulación de la correspondiente bioactividad e incluso sus propiedades farmacocinéticas (74).

El descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos a partir de una quimioteca depende fundamentalmente de la capacidad para identificar métodos de cribado (screening) eficaces. Un diseño adecuado de quimiotecas incrementa la probabilidad de tener éxito en el descubrimiento de nuevos fármacos. En la actualidad existe un gran interés académico y empresarial en acceder a quimiotecas de calidad para su análisis o cribado farmacológico mediante estrategias de cribado in vitro denominadas "Phenotypic-based Drug Discovery (PDD)" (descubrimiento de fármaco basado en el fenotipo) o "Target-based Drug Discovery (TDD)" (descubrimiento de fármaco basado en la diana). En el cribado basado en el fenotipo (PDD) se desarrollan ensayos para investigar/determinar un determinado fenotipo clínicamente relevante en un sistema fisiológico apropiado. En este tipo de cribado no se requiere conocer previamente el mecanismo de acción del producto, y por lo tanto, generalmente no existe hipótesis de partida; sin embargo, sí que se requieren sistemas celulares complejos. De esta forma, resulta clave la elección apropiada del ensavo de cribado y completar estos estudios con el cribado virtual para cubrir la mayor cantidad de mecanismos de acción o dianas que sea posible (Figura 5) (75).



*Figura 5.* Esquema de las estrategias para el cribado farmacológico de quimiotecas (tomado de (76, 77)).

Además, el cribado virtual (in silico) puede permitir el descubrimiento de la diana de acción de los productos líderes seleccionados por el cribado fenotípico. La metodología in silico está compuesta por un conjunto de herramientas computacionales que permiten a la industria farmacéutica tomar decisiones racionales durante las diferentes etapas del diseño de un fármaco, tanto a nivel de la identificación de una diana biomolecular de interés terapéutico, como del estudio de las potenciales interacciones fármaco-diana (docking molecular). Esta metodología permite la selección y desarrollo de la estructura química de un compuesto con potencial de convertirse en un nuevo fármaco y de su posterior modificación con el objetivo de mejorar su afinidad, bioactividad propiedades farmacodinámicas y sus y farmacocinéticas. Además, el gran desarrollo actual de las técnicas computacionales, consistentes en una serie de programas informáticos que son aplicados en alguna parte del proceso de descubrimiento y/o desarrollo de un fármaco, está permitiendo que los métodos in silico hayan mejorado considerablemente la identificación y optimización de compuestos con potencial farmacológico. Estas técnicas han permitido hasta la fecha el diseño de más de cincuenta compuestos que han entrado en diversos ensayos clínicos, algunos de los cuales ya han sido aprobados por la Agencia Americana de Alimentos y Medicamentos, FDA (*Food and Drug Administration*) (revisado en (78)).

Por otro lado, en el cribado basado en objetivos moleculares (TDD), se parte de la diana y por lo tanto se requiere conocer, al menos en parte, el mecanismo de acción del producto. Por lo tanto, esta estrategia de cribado sí que parte de una hipótesis preestablecida y en ella se interrogan dianas validadas. Posteriormente, se diseñan uno o varios ensayos basados en la diana para realizar el cribado y así seleccionar el o los productos líderes (Figura 5) (75).

El desarrollo de fármacos para una enfermedad dada comenzaba tradicionalmente con un cribado basado en fenotipo (PDD) de una biblioteca de compuestos, pero en las últimas décadas la detección selectiva de fármacos basada en objetivos moleculares (TDD) se ha convertido en el principal paradigma de descubrimiento de fármacos, utilizado tanto en la industria farmacéutica como en centros de investigación. Sin embargo, la reducción significativa en el número de fármacos recientemente aprobados en los últimos años ha sido parcialmente atribuida a fracasos en el descubrimiento y la validación de nuevas dianas, con lo que ha resurgido el interés por el cribado basado en fenotipo (PDD), con la esperanza de que la nueva aplicación de este enfoque tradicional pueda favorecer el descubrimiento temprano de fármacos y mejorar las tasas de éxito en etapas avanzadas de desarrollo de los mismos (75).

Tal como se ha comentados anteriormente, el cribado basado en fenotipo suele ser fisiológicamente más relevante y menos artificial porque se usan células, tejidos o modelos animales. Este tipo de cribado es, por tanto,

útil para muchas enfermedades en las que no se ha identificado o no se ha validado una diana para el fármaco. Sin embargo, no hay que olvidar que la caracterización en profundidad de las propiedades del fármaco incluyendo el mecanismo de acción y las dianas moleculares puede ayudar en el diseño de nuevos compuestos mejorados y con menos efectos adversos. Una combinación de ambas estrategias parece ser la opción más adecuada para la obtención de nuevos fármacos (75).

# **3.2.** Búsqueda de compuestos antitumorales a partir de productos naturales

Los fármacos derivados a partir de productos naturales o productos naturales *per* constituyen actualmente el principal se. arsenal quimioterapéutico empleado para el tratamiento del cáncer, representando aproximadamente el 60% de los fármacos disponibles. De esta forma, los fármacos que interfieren con la división y proliferación celular, incluyendo los agentes alguilantes, alcaloides, agentes que afectan a la polimerización de la tubulina, y los inhibidores de la topoisomerasa, son ejemplos de agentes citotóxicos (que promueven la muerte celular) ampliamente empleados en la terapia del cáncer. Muchos de ellos han derivado de productos naturales muy relevantes como son el taxol, vinblastina, vincristina, antraciclina, daunomicina y doxorubicina (79).

Durante la búsqueda y desarrollo de un fármaco con propiedades antitumorales se evalúa su efecto sobre dianas moleculares implicadas en la carcinogénesis, su efecto sobre la supervivencia y proliferación de cultivos de células cancerosas y su capacidad de inhibir el crecimiento del tumor en modelos animales (generalmente ratones inmunodeprimidos con tumores inducidos subcutáneamente), asumiendo las limitaciones de este abordaje a la hora de extrapolar resultados a la especie humana.

Tal como se ha comentado anteriormente, la inexistencia de un proceso efectivo de muerte celular programada o apoptosis es un rasgo característico del cáncer, ya que la alteración o mutación de los diferentes reguladores de la apoptosis conduce invariablemente a la tumorigénesis. Al respecto, es importante destacar que el surco menor del ADN constituye otra diana importante para el tratamiento antitumoral. Así, la trabectedina (también conocida como ecteinascidina-743 o ET-743) v con nombre comercial Yondelis, es un ejemplo de un compuesto derivado de un producto natural marino que se une al surco menor del ADN, empleado en su lanzamiento para el tratamiento quimioterápico del sarcoma de tejidos blandos y del cáncer de ovario, aunque se sigue investigando su aplicación para el tratamiento de otros tipos de cáncer y ya se ha ampliado su uso para nuevos tipos de cáncer (80). La trabectedina se une selectivamente a la guanina del ADN provocando una deformación de la estructura molecular de la hélice y consecuentemente, una alteración de los procesos del ciclo celular que provocan la apoptosis.

Por otro lado, las proteínas quinasas que regulan los procesos de señalización intracelular implicados en crecimiento celular, diferenciación y apoptosis, constituyen dianas potenciales para el desarrollo de fármacos antitumorales (81-87). Uno de los ejemplos más representativos de estas vías de señalización es la vía de JAK/STAT. Tal como se ha comentado, la desregulación de esta importante ruta de señalización está implicada en el desarrollo, tanto de diversos tipos de cáncer (sólidos y hematológicos) (18-21, 49), como de otras patologías, como por ejemplo las inflamatorias (88).

En la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos antitumorales, tradicionalmente, ha primado la "regla del nanomolar", por la que se consideraban mejores candidatos para estudios futuros a aquellos compuestos que producen el efecto deseado dentro del rango de concentración nanomolar (nM). Esta regla hace referencia, por tanto, a la potencia farmacológica, la cual se refiere a la actividad de un fármaco en términos de la concentración necesaria para producir un efecto determinado. Sin embargo, la potencia in *vitro* de un determinado compuesto es sólo uno de los múltiples factores que contribuyen a la posible eficacia clínica. El término eficacia se refiere a la medida de la capacidad de un fármaco para producir una respuesta. De esta forma, aspectos físicoquímicos, farmacocinéticos y toxicológicos influyen considerablemente en la potencia total del compuesto en cuestión. Por ejemplo, algunos de estos parámetros importantes (entre otros muchos) son el peso molecular del fármaco, su liposolubilidad, la biodisponibilidad (proporción de fármaco que pasa a la circulación sistémica, y llega intacto, en concentración y en tiempo adecuado al lugar de acción), la concentración mínima eficaz (concentración por encima de la cual se observa el efecto terapéutico) o la concentración mínima tóxica (a partir de la cual suelen aparecer efectos tóxicos), entre otros. En general, cuando se estudia como opción terapéutica un nuevo fármaco se busca el equilibrio entre la potencia y la seguridad (89, 90).

### 3.3. Naftoquinonas y derivados como fármacos antitumorales.

Las quinonas son una clase de compuestos orgánicos cuyas propiedades químicas les permiten interactuar con dianas biológicas, formando enlaces covalentes y actuando como agentes de transferencia de electrones en reacciones de oxidación-reducción. Estas propiedades y sus efectos sobre las macromoléculas celulares han llevado al uso de quinonas, especialmente NPQ (*naftoquinonas*), en el tratamiento de diferentes estados patológicos relacionados con procesos inflamatorios y cáncer (91). Los antibióticos antraciclínicos (daunorubicina, doxorrubicina, idarubicina) son compuestos con estructura quinónica usados en tratamientos de distintos tipos de cáncer como leucemias, linfomas, cáncer de mama y útero, entre otros. Otros ejemplos de quinonas utilizados clínicamente para la quimioterapia contra el cáncer son bleomicinas, dactinomicina y mitomicina-C (92). Además, numerosos derivados de naftoquinona, tanto naturales como sintéticos, exhiben acciones que sugieren un posible uso como agentes antitumorales, habiéndose descrito actividad antitumoral para las 1,4-NPQ (revisado en (92) y 1,2-NPQ (revisado en (91)). Concretamente, se han descrito derivados de naftoquinonas capaces de suprimir la ruta de señalización de STAT en células tumorales (91, 92).

El juglona, también denominado 5-hidroxi-1,4compuesto naftalenodiona, induce la apoptosis y la parada del ciclo celular en fase S en células HaCaT (immortalized human keratinocytes (revisado en (93)). Además, también se ha demostrado que derivados naftoquinónicos con grupos sulfihidrilos presentan una potente actividad antiproliferativa en líneas de cáncer de próstata, mama y colon, asociada a una inhibición de la dimerización de STAT3 (92). Otros ejemplos descritos de este tipo de compuestos con actividad antitumoral son la plumbagina, lapachona y shikonina (94, 95). La plumbagina inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis en células tumorales de pulmón A549 mediante la modulación de diferentes vías de transducción de señales tales como STAT3 y p53, entre otras (96). Además, este compuesto inhibe la vía PI3K/Akt/mTOR, promoviendo la detención de G2-M y la autofagia en dos líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB23 y MCF-7) (97). Por otro lado, el derivado 1,2-NPQ  $\beta$ -lapachona inhibe la topoisomerasa I y II del ADN y modula la actividad de moléculas relacionadas con la transducción de señales, resultando en la inhibición del crecimiento y en la muerte celular por apoptosis en diversos tipos de cáncer (revisado en (91)). Finalmente, la shinkonina es una naftoquinona natural con actividad citotóxica descrita para varios tipos de cáncer. Su mecanismo de acción se basa en la generación de ROS (reactive oxygen species), en la inhibición de la topoisomerasa I y II e inducción del corte del ADN y apoptosis (92).

Por tanto, las naftoquinonas pueden resultar un excelente punto de partida para generar derivados con una potente actividad antitumoral a través de diferentes mecanismos de acción, incluyendo la inhibición de la vía de señalización de JAK/STAT. **Planteamiento y Objetivos** 

El objetivo principal de esta Tesis, el descubrimiento de nuevas moléculas antileucémicas, no hubiese sido posible de alcanzar sin la colaboración entre grupos de investigación multidisciplinares. Estos profesionales colaboraron con el fin común de obtener nuevas moléculas y de investigar sus actividades biológicas en modelos de enfermedad relevantes. Para ello, fue necesario utilizar una estrategia de cribado farmacológico *in vitro*, eficiente, que permitiera tener éxito en un tiempo razonable.

Como se explicó en la introducción de este trabajo, las estrategias para el descubrimiento de pequeñas moléculas con interés farmacológico en Medicina están basadas, primariamente, en ensayos de cribado *in vitro*. Estos se basan, mayoritariamente, en dos planteamientos: 1) interrogar dianas moleculares concretas, con interés terapéutico validado (*Target-based drug discovery-TDD-*) y/o 2) identificar cambios fenotípicos en modelos celulares complejos pero representativos de la patología de interés (ej., cancer) (*Phenotypic-based drug discovery-PDD-*), en vez de interrogar dianas moleculares concretas (77). El uso del cribado de librerías químicas basado en la estrategia fenotípica se ha revalorizado en los últimos años y es el que, mayoritariamente, usa la industria farmacéutica actual. Esta estrategia es la que también se ha utilizado en este trabajo de Tesis (76, 77).

En una primera etapa, nos planteamos un cribado fenotípico, en modelos celulares de cáncer humano, de librerías químicas enriquecidas en estructuras de pequeño tamaño molecular relacionadas con naftoquinonas. En una segunda etapa, llevamos a cabo el estudio de los mecanismos moleculares de los productos más eficientes *in vitro*. Debido a que estos productos mostraron una mayor eficacia antitumoral en células donde la ruta de señalización JAK/STAT era biológicamente muy relevante, abordamos el análisis directo de la misma (TDD). Para una mejor organización y comprensión del trabajo realizado, se ha dedicado un capítulo independiente a cada uno de estos compuestos. Sin embargo, las secciones de Introducción,

Material y Métodos y Discusión se comparten, debido a los aspectos que tienen en común.

El Capítulo I está dedicado al compuesto CM363, cuyos resultados han sido publicados recientemente (Guerra, B. et al. Oncotarget. 2017, 8(18):29679-29698). El Capítulo II está dedicado al compuesto ihf-c6. En él se recogen los resultados obtenidos hasta el momento. Actualmente, nuestro grupo de investigación sigue trabajando para profundizar en el estudio del mecanismo de acción del ihf-c6 y de derivados diméricos cumarinanaftoquinonas (Proyecto MINECO SAF2015-65113-C2-2 -- Desarrollo preclínico de nuevas estructuras bioactivas moduladoras de las actividades oncogénicas de STAT3/5 o de los Receptores de Estrógenos).

Los objetivos concretos del presente trabajo fueron:

- Cribado fenotípico *in vitro* de quimiotecas, enriquecidas en derivados naftoquinónicos, en modelos celulares de cáncer humano hematológico y no-hematológico.
- Investigación del mecanismo de acción del/los producto/s seleccionados en relación con procesos biológicos relevantes como proliferación, ciclo celular o muerte celular.
- Exploración del mecanismo de acción en el contexto de las dianas moleculares STAT3 y STAT5.
- 4. Evaluación *in vitro* de la eficacia antitumoral en modelos de CML humano resistentes a fármacos convencionales como IM.
- 5. Evaluación *in vivo* de la eficacia antitumoral, y toxicidad, en modelos de xenoinjerto de CML humana en ratones.

Material y Métodos
### 1. Agentes farmacológicos

Los ensayos correspondientes a la síntesis y purificación de los compuestos se llevaron a cabo en el Instituto de Bio-Orgánica Antonio González (IUBO, Universidad de La Laguna, Tenerife) y en los laboratorios de CEAMED, S.A. (La Laguna, Tenerife).

Las quimiotecas de donde proceden los productos objetos de estudio de este trabajo se han obtenido mediante síntesis orientada a la diversidad basada en estructuras privilegiadas (66).

El producto CM363 (Figura 1) es un derivado de naftoquinona, resultado de la reacción entre 2-hidroxinaftoquinona, 4-formilbenzonitrilo y 3-morfolinociclohex-2-enona (42).



*Figura 1.* Esquema de la molécula de CM363 [4-(1, 6, 11-trioxi-2,3,4,6,11,12 – hexahidro-1H-benzo [b] xanteno-12-yl) benzonitrilo].

El producto ihf-c6 (Figura 2) es un derivado de naftoquinona, resultado de la reacción multicomponente entre 2-hidroxi-1,4-naphthaquinone (lawsona), 4-hidroxicumarina y 3,4-dimetoxibenzaldehído (98).



*Figura 2. Esquema de la molécula de ihf-c6 [7-(3-4 – dimetoxifenil)–7H-5,14 dioxo - dibenzo [a,j] antraceno-6,8,9 triona].* 

### 2. Células

Todas las líneas celulares utilizadas en este estudio se adquirieron de la ATCC (*American Type Culture Collection*) excepto las PBMC (*Human Peripheral Blood Mononuclear Cells*), que se aislaron por centrifugación con *Ficoll-Paque Plus* (Amersham Biosciences) a partir de sangre de voluntarios sanos tratada con heparina (Tabla 1). Las células se crecieron en una atmósfera humidificada, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Cálulos	Time	Medio de
Celulas	Про	crecimiento
K562	Human Chronic Myeloid Leukemia	RPMI
K562-R	Human CML Imatinib resistance	RPMI
HEL	Human erythroleukemia	RPMI
HL60	Human Acute Myeloid Leukemia	RPMI
MOLM-13	Human Acute Myeloid Leukemia	RPMI
MV4.11	Human Acute Monocytic Leukemia	RPMI
HCT-15	Human Colorectal Adenocarcinoma	RPMI
PC3	Human Prostate Cancer	RPMI
MCF7	Human Breast Cancer	RPMI
NCTC 3749	Mouse Lymphoma	RPMI
MRC.5	Non-malignant Human Lung Fibroblasts	RPMI
PBMC	Human Peripheral Blood Mononuclear Cells	RPMI
L1210	Mouse Lymphocytic Leukemia	DMEM
Raw	Mouse Macrophage	DMEM
HeLa	Human Epithelial Cervix Cancer	DMEM
T47D	Human Breast Cancer Adenocarcinoma	DMEM
HEK GHR	Human Embryonic Kidney	DMEM-F12
SKBR3	Human Breast Cancer	McCoy's 5A

Tabla 1. Líneas celulares utilizadas, medios de cultivo y suplementos.

Todos los medios de cultivo se suplementaron con 10% FBS, 2mM L-Glutamine y Penicilina/Estreptomicina (*PEST*); para el caso de las T47D, además se suplementó con 1mM NaPyr y 10mM HEPES.

Los medios de cultivo, tripsina, FBS (*Fetal Bovine serum*), L-Glutamine, PEST (*Penicillin-Streptomycin*), Na-Pyruvate y HEPES se obtuvieron de las

casas comerciales Lonza (Bélgica) y Biowest (Francia). Los *flask*, placas *multiwell* y placas P100 utilizados se obtuvieron de la casa comercial NUNC (Dinamarca).

### 3. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados y las casas comerciales de las que se obtuvieron se muestran en la Tabla 2.

Anticuerpo	Casa Comercial	Anticuerpo	Casa Comercial
pSTAT5	Cell Signaling	Cyclin F	Cell Signaling
	Technology	Cyclin E	Technology
pBcr	Cell Signaling	nSTAT2	Cell Signaling
	Technology	p31A15	Technology
Bcr	Cell Signaling	ST & T2	Cell Signaling
	Technology	SIAIS	Technology
pJAK2	Cell Signaling	R actin	Santa Cruz
	Technology	D-actili	Biotechnology
JAK2	Cell Signaling	ST & T 5	Santa Cruz
	Technology	SIAIS	Biotechnology
pSrc	Cell Signaling	INIK	Santa Cruz
	Technology	JINK	Biotechnology
Src	Cell Signaling	Cyclin B	Santa Cruz
Sic	Technology	Cyclin B	Biotechnology
pERK 1/2	Cell Signaling	Weel	Santa Cruz
	Technology	weel	Biotechnology
ERK 1/2	Cell Signaling	CDK2	Santa Cruz
	Technology	CDK2	Biotechnology
Р38-МАРК	Cell Signaling	Mel-1	Santa Cruz
	Technology	10101-1	Biotechnology

Anticuerpo	Casa Comercial	Anticuerpo	Casa Comercial	
pJNK	Cell Signaling	D21	Santa Cruz	
	Technology	121	Biotechnology	
pAkt	Cell Signaling	Bel-2	Santa Cruz	
	Technology	Der-2	Biotechnology	
Akt	Cell Signaling	GAPDH	Santa Cruz	
	Technology	OAI DII	Biotechnology	
P77	Cell Signaling	Secondary antibody	Santa Cruz	
P27	Technology	goat anti-rabbit	Biotechnology	
Cyclin D3	Cell Signaling	Secondary antibody	Santa Cruz	
Cyclin D5	Technology	goat anti-mouse	Biotechnology	
pPB <sup>S780</sup>	Cell Signaling	Caspase 3	Enzo Life	
ркв	Technology	Caspase 5	Sciences	
<b>pPB</b> S807/811	Cell Signaling	Caspase	Enzo Life	
ркв	Technology	Caspaseo	Sciences	
Debl/ 1 \$296	Cell Signaling	Caspase 0	Enzo Life	
I CIIK I	Technology	Caspase 3	Sciences	
Pchk2 <sup>T68</sup>	Cell Signaling	Cytochrome C	BD Biosciences	
T CHIK2	Technology	e y toemonie e		
vH2AX	Cell Signaling	Cyclin A	BD Biosciences	
γπ2ΑΛ	Technology	e yenn rx		
pS6	Cell Signaling	PARP	BD Biosciences	
	Technology	17110	DD Diosciences	
<b>S</b> 6	Cell Signaling	BUBR1	BD Biosciences	
	Technology	DODKI	DD Diosciences	
Cdc25C	Cell Signaling	Bcl-X	BD Biosciences	
	Technology	Dura		

Tabla 2. Anticuerpos y casas comerciales.

#### 4. Ensayos de viabilidad celular

### 4.1. Ensayo de reducción metabólica del tetrazolium salt 3-(4,5methyltiazol- 2yl-)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)

La metabolización mitocondrial del MTT (99) (Applichen, Alemania) se utilizó como indicador de la viabilidad celular.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (BD Falcon, Francia) a una densidad de crecimiento exponencial (5000 - 20000 células/pocillo, dependiendo de la línea celular). Se dejaron crecer 18 - 24 horas y se trataron con vehículo (0,05% de DMSO (*dimetilsulfóxido*)) o compuesto (0,01 - 10  $\mu$ M) durante 48 - 72 h. Tras el periodo de tratamiento, se añadió MTT (0,3 mg/ml) en medio de cultivo y se incubaron las células a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 2 - 4 horas (según la línea celular). Las células se lisaron en SDS al 10% y la densidad óptica se midió a 595 nm con el lector de placas iMark Microplate Reader (BioRad, California, USA).

### 4.2. Fotomicroscopía a tiempo real

La monitorización de las cinéticas de proliferación celular y citotoxicidad se llevaron a cabo utilizando el sistema de imágenes a tiempo real IncuCyte<sup>TM</sup> HD (Essen BioScience, Hertfordshire, Reino Unido). Este microscopio IncuCyte<sup>TM</sup> permite la adquisición de imágenes automatizadas mediante contraste de fase. Se sembraron células K562 a una densidad de 5.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos pretratada con polilisina (100). Las células se dejaron crecer 18 - 24 horas y se trataron con diferentes concentraciones de compuesto (0,01 - 10  $\mu$ M) o vehículo y en presencia de 25 nM de YOYO-1 (un marcador fluorescente que sólo atraviesa la membrana celular si está comprometida y se une al ADN). Esta técnica

permite cuantificar y descartar las células muertas y/o con la membrana celular desestructurada (aparecen marcadas con el fluorocromo verde). Las imágenes individuales se procesaron mediante un algoritmo de confluencia basado en imágenes de contraste de fase que calcula el porcentaje de confluencia monocapa para cada imagen y a distintos tiempos. Se recogieron múltiples imágenes por pocillo para proporcionar una medida estadística representativa de la confluencia (porcentaje de confluencia/pocillo) y los datos se representaron como AUC (*Area Under Curve*).

### 5. Ensayos de luciferasa con genes reporteros

La línea celular HEK293, transfectada establemente con GHR (HEK-GHR) (101), se usó para determinar los efectos de los compuestos sobre la actividad transcripcional dependiente de STAT5 regulada por rhGH (Pfizer Spain laboratorios, Madrid, España). Las células se sembraron a una densidad de 400.000 células/pocillo en placas de 12 pocillos y se dejaron crecer 24 h. Se retiró el medio de crecimiento y se co-transfectaron, en ausencia de suero, con el plásmido pSPI-GLE1-Luc (102) (1 µg) y el plásmido de expresión de  $\beta$ -galactosidasa (0,05 µg) (Thermo Scientific, Illinois, USA), durante 16 - 18 h, usando Metafectene Pro® (Biontex, Alemania). Se retiró el medio de transfección y se trataron las células con vehículo (0.05% DMSO) o compuesto (0.1 - 10 µM) en ausencia de suero v durante 1 h. Tras la pre-incubación con el fármaco, se añadió rhGH (50nM) (103) (Pfizer Spain laboratorios, Madrid, Spain) y se incubaron las células durante 6 h adicionales. Posteriormente, las células se lisaron en PLB (Passive Lysis Buffer) (Promega, Wisconsin, USA) y se determinó la actividad luciferasa mediante el sistema de ensayo de luciferasa (Thermo Scientific, Illinois, USA). Las lecturas se realizaron utilizando el lector de microplacas Fluoroskan Ascent FL (Labsystems). Los resultados se expresan como unidades de RLU (Relative Luciferase Units) por mg de proteína y actividad de  $\beta$ -galactosidasa, normalizados por los resultados obtenidos con las células control (tratadas con vehículo).

La línea celular HeLa/STAT3-luc (Panomics, Fremont, USA), transfectada establemente con el gen reportero de luciferasa, se usó para determinar los efectos de los compuestos sobre la actividad transcripcional dependiente de STAT3 y regulada por la OSM (Oncostatina M) (HumanZyme; Illinois, USA) (104). Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos a una densidad de 240.000 células/pocillo, se dejaron crecer durante 24 h y, a continuación, se privaron de suero (0,5% FBS) durante 16 h. Posteriormente, se trataron las células con vehículo (DMSO al 0,05%) o compuesto (0,1 - 10  $\mu$ M) durante 1 h. Tras la pre-incubación con el fármaco o vehículo, se añadió OSM (50 ng/ml) (HumanZyme, Illinois, USA) y se incubaron las células durante 6 h adicionales. Las células se lisaron en PLB (*Passive Lysis* Buffer) (Promega, Wisconsin, USA) y se determinó la actividad luciferasa mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente para las células HEKGHR.

# 6. Ensayos para el análisis del ciclo celular y evaluación de la apoptosis

Los ensayos de citometría de flujo para el análisis del ciclo celular y la evaluación de la apoptosis se llevaron a cabo en el laboratorio del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC, Universidad de Salamanca).

Las células K562 se trataron con vehículo (0,05% DMSO) o compuesto en presencia de FBS, durante 2 días con diferentes concentraciones (0,1; 0,5; 1  $\mu$ M) de fármaco, o con una dosis fija de fármaco (1  $\mu$ M) durante un periodo de tiempo variable (1, 2 y 3 días). A continuación, las células se fijaron en etanol al 70% y se incubaron con PI (*Yoduro de Propidio*) en presencia de RNasa. Las muestras se analizaron con un citómetro FACSCalibur y CellQuest software (BD Biosciences, Erembodegen, Bélgica) (105). Los núcleos a la izquierda del pico 2N que contenían ADN hipodiploide se consideraron apoptóticos.

La presencia de apoptosis se determinó mediante citometría de flujo cuantificando la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática de las células K562 tratadas con 1 µM del fármaco durante 1, 2 ó 3 días. Se utilizó el kit de detección de apoptosis Annexin V-FITC (BD Pharmingen; Erembodegen, Bélgica; ver Anexo) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para evaluar la morfología nuclear se usó la tinción con el fluorocromo trihidrocloruro de bisbencimida (Hoescht 33258; Sigma Aldrich, Missouri, USA). Se sembraron las células K562 a una densidad de 125.000 células/ml en placas P100. Tras 24 h de crecimiento, se trataron las células con 5  $\mu$ M del fármaco durante 24 y 36 horas adicionales. Las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 3%. Una vez fijadas (desde una noche hasta varios días), se lavaron con PBS y se resuspendieron, en oscuridad, en 20  $\mu$ l de una solución en PBS (16  $\mu$ g/ml) (Hoescht 33258), durante 15 min. Se tomaron 10  $\mu$ l de la suspensión celular, se vertieron en un porta y se selló el cubre con laca de uñas. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia y se tomaron fotografías de distintos campos representativos. Se consideraron núcleos apoptóticos aquellos que estaban fragmentados en tres o más cuerpos apoptóticos.

### 7. Análisis de la interacción STAT-ADN

Las células T47D se trataron con vehículo (0,05% DMSO) o CM363  $(5\mu M)$  durante 30 minutos, y posteriormente estimuladas con GH (50nM) durante 10 min o IL-6 (25ng/ml) durante 30 min. A continuación, las células se lavaron con PBS-ortovanadato (1mM) frío. Se obtuvieron extractos de

proteínas nucleares, en presencia de inhibidores de fosfatasa e inhibidores de proteasa, mediante un kit para la obtención de Extracto Nuclear (Active Motif Inc., CA, USA; ver Anexo), siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. Se midieron las actividades de unión al ADN, específicas para STAT5 o STAT3, en extractos nucleares, usando el protocolo del kit TransAM STAT (Active Motif, California, USA; ver Anexo). La concentración de proteína se midió mediante el ensayo con ácido bicinconínico (Pierce® BCA Protein Assay Kit; Thermo Scientific, Illinois, USA). La absorbancia se cuantificó con el lector de microplaca iMark Microplate Reader (BioRad, California, USA).

### 8. Inmunodetección de proteínas. Ensayos de Western Blot

Las células se trataron con vehículo (0,05% DMSO) o compuesto, en presencia o ausencia de FBS, según el ensayo, y tal y como se indica en los pies de las figuras. A continuación, las células se lavaron con PBSortovanadato (1mM) frío, se centrifugaron y el precipitado se re-suspendió en un volumen adecuado de RIPA (Pierce, Illinois, USA), en presencia de inhibidores de proteasa y fosfatasa, para la obtención del extracto proteico total. Las muestras se dejaron en agitación suave durante 30 min a 4°C, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 min y 4°C, y se tomó el sobrenadante. Se cuantificó la cantidad de proteína mediante el ensayo con ácido bicinconínico (Pierce® BCA Protein Assay Kit; Thermo Scientific, Illinois, USA). Cantidades iguales de cada muestra se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (iBlot® Gel Transfer Stacks; Invitrogen, Barcelona, España). Las membranas se bloquearon con 1% BSA - 1% Blotto (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) para los anticuerpos fosforilados o 5% Blotto para los anticuerpos totales (ambos diluidos en tampón salino Tris con Tween 20 al 0,05%). Tras el bloqueo, las membranas se incubaron toda la noche, a 4°C y en agitación, con los anticuerpos primarios (dilución 1:1000), específicos para proteína fosforilada o para proteína total. El marcaje específico del anticuerpo primario se reveló mediante incubación con un anticuerpo secundario (diluido 1:5000) de cabra anti-ratón conjugado con HRP (*Horseradish Peroxidase*) o de cabra anti-conejo conjugado con HRP, a temperatura ambiente, durante 1h y en agitación. Tras el lavado de las membranas, se procedió al revelado utilizando el sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, California, USA) y el programa de análisis de imágenes Quantity One (Bio-Rad Laboratories, California, USA). Como control de carga y de eficiencia de transferencia a la membrana, se eliminó el anticuerpo primario y las membranas se re-hibridaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-beta actina o policlonal de conejo anti-GAPDH (106).

El *array* para el análisis de fosfoproteinquinasas en las células K562 se llevó a cabo utilizando el kit Profiler Human Phospho-Kinase Array ARY003B (R & D Systems, Minneapolis, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ver Anexo).

### 9. Análisis de la expresión génica mediante PCR (*Polimerase Chain Reaction*) cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Las células K562 se sembraron a una densidad de 300.000 células/ml y se trataron con vehículo (0,05% DMSO) o compuesto (3 µM), en presencia de FBS y durante distintos tiempos (6, 12, 24, 32 horas), tal y como se indica en las leyendas de las figuras. Los niveles de expresión de mARN de los genes se estimaron utilizando qPCR, tal y como se describió anteriormente (107). Brevemente, el ARN total se aisló después de homogeneizar las células con TriReagent (Sigma, Missouri, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El rendimiento del ARN obtenido se midió por absorbancia de UV y se analizó la calidad del ARN total utilizando un

Experium (BioRad, California, USA). Todas las muestras se trataron con DNAsa libre de RNAsa (Promega, Madison, WI). Se tomaron 2µg de ARN total de cada muestra y se transcribieron inversamente a ADNc (ADN complementario) utilizando el kit iScriptTM (BioRad, California, USA; ver Anexo). Una vez sintetizado el ADNc, se usaron 2µl de cada muestra, como molde, en una mezcla de reacción de 20 µl para la qPCR que contenía los primers y SYBR Green (Diagenode, Bélgica). La cuantificación de la expresión génica se realizó con un Sistema ABI PRISM7000 SD PCR (Applied Biosystems, California, USA). Se creó una curva estándar relativa con diluciones seriadas (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) utilizando una mezcla equitativa de ADNc de todos los grupos incluidos en el estudio. El programa de amplificación consistió en 1 ciclo de 95 ° C durante 10 min, seguido de 45 ciclos de: 95 °C durante 15 seg (fase de desnaturalización), 54°C durante 10 seg (fase de apareamiento) y 72 °C durante 30 seg (fase de polimerización). La intensidad de la fluorescencia se midió a la temperatura específica de adquisición de cada gen.

Se evaluó la especificidad de los *primers* y la uniformidad de los productos generados por PCR. Los datos y gráficas de amplificación se obtuvieron con el software ABI SDS. Todas las amplificaciones se realizaron por triplicado, y la media de valores de Ct se usó para los cálculos de los valores de expresión relativos. El nivel de mARN individual medida por la qPCR se normalizó por el nivel del gen *housekeeping* GAPDH utilizando el método de Pfaffl (108). Los *primers* específicos fueron diseñados por el programa Primer 3 (109) (Tabla 3).

Genebank	Gene Product	Gene	Fordward	Reverse
NM_002467.4	Myelocytomatosis oncogene	myc	CCAGCAGC GACTCTGA GG	CCAAGA CGTTGT GTGTTC
NM_002648.3	Serine/threonine kinase	Pim1	GCTCGGTC TACTCAGG CATC	CATTAG GCAGCT CTCCCC AG
NM_001289746.1	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	GAPDH	CCATGGAG AAGGCTGG GG	CAAAGT TGTCAT GGATGA CC

**Tabla 3.** Nombre de los genes y secuencias (5' - 3') de los primers utilizados en las reacciones de qPCR.

# 10. Análisis de la combinación de fármacos (determinación del Índice de Combinación)

Estos ensayos a punto final se realizaron simultáneamente a los ensayos de MTT, incorporando un tercer grupo de replicados en los que las células se cultivaron en presencia de una combinación de proporción constante de CM363 e IM (proporción 5 (CM363):1 (IM)) a lo largo de un amplio rango de diluciones de los productos. En estos experimentos se determinó el grado de inhibición de la viabilidad celular causada por el CM363, IM o la combinación de ambos con respecto a las células tratadas con el vehículo (0 = todas las células vivas; 1 = todas las células muertas). Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado para cada combinación de los productos. Posteriormente, se analizó el efecto del tratamiento con los productos sobre la viabilidad de las células K562 para, de ese modo, calcular una serie de estimaciones de las respuestas obtenidas para los fármacos

individuales o en combinación. Estas estimaciones permiten detectar efectos sinérgicos (potenciados), aditivos (sumados) o antagónicos. En cada caso, el análisis permite generar gráficas que representan los índices de combinación medios (CI, medida del grado de sinergia) frente a los efectos obtenidos (IC20, IC50, IC70 e IC90). Un CI menor que 1 indica acción sinérgica de los productos combinados, igual a 1 indica acción aditiva de los productos combinados y mayor que 1 indica efecto antagónico originado por la combinación. Las curvas dosis-efecto del tratamiento con fármacos, individualmente o en combinación, se analizaron mediante el método de Chou y Talalay usando el software Calcusyn (Biosoft, Cambridge, Reino Unido) (110).

# 11. Análisis del efecto de CM363 sobre xenoinjertos de tumores humanos en ratones

Los ensayos *in vivo* de xenoinjertos de tumores humanos en ratones se llevaron a cabo en el laboratorio del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC, Universidad de Salamanca), de acuerdo con las normas éticas y con la Declaración de Helsinki, siguiendo las directrices nacionales e internacionales y de acuerdo con las leyes nacionales y de la Unión Europea. Los experimentos con animales se realizaron siguiendo el protocolo previamente aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

En estos experimentos se utilizaron ratones atímicos hembra de seis semanas de edad (NOD-SCID) (Charles River, Barcelona, España), que fueron alojados en un dispositivo de aislamiento libre de patógenos (111). Los ratones se inocularon subcutáneamente en el flanco derecho con 2,5 x  $10^6$  células K562 en 100 µl de medio RPMI-1640 y 100 µl de matrigel. Llegado el momento en que los tumores se podían palpar, los ratones se asignaron al azar en tres grupos (n = 8 por grupo): el grupo control (sólo fue

tratado con vehículo – DMSO: PEG-400: agua estéril a 5:25:70 (p/v)), el grupo que recibió CM363 10 mg/kg y el grupo que recibió el control positivo IM 40 mg/kg. Los tratamientos de vehículo y CM363 se administraron por inyección intraperitoneal (i.p.) todos los días excepto los sábados y domingos, mientras que IM se administró por vía oral con el mismo patrón horario. El estudio se realizó durante un período de 25 días. Las mediciones de calibre de los diámetros del tumor se realizaron dos veces por semana y el volumen del tumor se estimó como el volumen de una elipse usando la siguiente fórmula:  $V= 4/3n x (a/2) x (b/2)^2$ , donde *a* corresponde al diámetro más largo y *b* corresponde al diámetro más corto. Los ratones se eutanasiaron cuando el diámetro de los tumores alcanzó los 2 cm o cuando se observó que los animales estaban agonizando.

### 12. Análisis estadístico

Los resultados representan datos obtenidos de, al menos, dos experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por duplicado o triplicado (media ± SEM). La comparación entre grupos se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) unidireccional, seguido de un test comparativo de medias grupales, utilizando el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA). La concentración requerida para estimar la viabilidad/proliferación celular al 50% (IC50) se determinó gráficamente usando el algoritmo de ajuste de la curva por regresión no lineal del GraphPad Prism 5. Para el caso de los experimentos *in vivo*, las diferencias en los volúmenes de los tumores entre el grupo control y el grupo tratado se analizó usando la prueba de Mann-Whitney.

## **Capítulo I**

# Evaluación de la actividad antitumoral del compuesto CM363

Guerra, B. et al. Oncotarget. 2017, Vol.8, (No. 18), pp: 29679-29698

### 1. CM363 inhibe la viabilidad de células de leucemia humana

Se estudió la viabilidad en distintas líneas celulares de tumores hematológicos y sólidos, así como en células sanas, en crecimiento exponencial y en presencia de CM363 durante 48 horas y utilizando el ensayo de la reducción del MTT, el cual permite determinar la metabolización mitocondrial de este compuesto y está ampliamente validado para el estudio del crecimiento y la supervivencia celular (99).

Los resultados de estos experimentos muestran que el compuesto CM363 reduce significativamente la viabilidad de todas las líneas celulares de leucemia humana ensayadas (K562, MOLM.13, MV4.11, HEL y HL60) con alta eficacia (Tabla 1).

	IC50 (µM)
Línea celular	Mean ± SD
Raw	$0.1 \pm 0.2$
HEKGHR	$0.6 \pm 0.2$
K562	$0.7 \pm 0.5$
MOLM.13	$0.7 \pm 1.1$
NCTC3749	$1.1 \pm 0.7$
MV4.11	$1.2 \pm 1.1$
HEL	$1.3 \pm 0.3$
HL60	$1.3 \pm 0.6$
T47D	$1.3 \pm 1.2$
PC3	$1.5 \pm 1.0$
MCF7	$1.7 \pm 1.1$
SKBR3	$2.6 \pm 0.7$
HCT-15	$3.3 \pm nd$
L1210	$3.4 \pm 0.4$
MRC.5	$3.5 \pm 0.0$
HeLa	$4.8 \pm 0.4$
PMBC	>5

**Tabla 1.** Efecto del CM363 sobre la viabilidad de distintas líneas celulares estimado mediante el ensayo colorimétrico de la reducción de MTT (nd: no determinado).

Los valores de IC50 para las células K562 (IC50 =  $0,7 \pm 0,5 \mu$ M), HEL (IC50 =  $1,3 \pm 0,3 \mu$ M) y HL60 (IC50 =  $1,3 \pm 0,6 \mu$ M) fueron sensiblemente inferiores a los observados para algunas células no hematológicas (HeLa =  $4,8 \pm 0,4 \mu$ M) y células no malignas (MRC-5 =  $3,5 \pm 0,01 \mu$ M y células PBMC> 5  $\mu$ M), siendo, por tanto, menos sensibles a la inhibición de la viabilidad celular por CM363 (Figura 1).



**Figura 1.** Células K562 (•), HEL (•), HL60 ( $\blacktriangle$ ), Hela ( $\varDelta$ ), MRC5 ( $\Box$ ), y PMBC ( $\circ$ ) se cultivaron durante 48 horas en presencia de diferentes concentraciones del fármaco (0,01 - 10  $\mu$ M). Se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT.

En otro grupo de experimentos se monitorizó el crecimiento de las células K562 en presencia del CM363 mediante la obtención de imágenes de las células a tiempo real. Los resultados obtenidos en estos experimentos mostraron que CM363 causa un efecto citostático en el crecimiento celular a concentraciones inferiores a 1  $\mu$ M (IC50<sub>AUC</sub> = 0,6 ± 0,3  $\mu$ M) e induce un efecto citotóxico a mayores concentraciones (EC50<sub>AUC</sub> = 1,1 ± 0,4  $\mu$ M) (Figura 2).



**Figura 2.** Se cultivaron células K562 en presencia del vehículo o de concentraciones crecientes de CM363 (0,03 - 10  $\mu$ M) durante 4 días. Los efectos del producto sobre la proliferación (•) y citotoxicidad (•) fueron estudiados usando el sistema de análisis a tiempo real Incucyte<sup>TM</sup> HD. Los datos obtenidos se representan como área bajo la curva (AUC).

Para estudiar el efecto residual del fármaco sobre la viabilidad y la proliferación tras una exposición transitoria al mismo, se examinaron células K562 expuestas temporalmente a CM363 (1 - 3  $\mu$ M) durante 6 - 24 horas. Transcurrido el tiempo de preincubación, se retiró el CM363 del medio y se dejaron crecer durante 1 - 2 días adicionales. La exposición de las células K562 a 3  $\mu$ M CM363 durante 6 h, seguido de 48 h en medio de cultivo libre de CM363, causó una disminución significativa de la viabilidad celular K562 (Figura 3).



**Figura 3.** Las células K562 fueron transitoriamente expuestas a 1 ó 3  $\mu$ M CM363 durante 6 ó 24 h. Transcurrido ese tiempo, se retiró el compuesto y se dejaron crecer durante 24 o 48h adicionales. Se estudió la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. \*\*\*P < 0.001 y \*P < 0.05 con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).

Además, cuando se analizaron los efectos de la exposición transitoria al compuesto utilizando el sistema de imágenes de células vivas a tiempo real, se observó que 2 horas de exposición transitoria a CM363 (IC50<sub>AUC</sub> =  $1,9 \pm 0,5 \mu$ M) fue suficiente para causar un efecto citostático en células K562 durante las 72 horas adicionales (Figura 4).



**Figura 4.** Las células K562 fueron transitoriamente expuestas a 0.3, 1 ó 3  $\mu$ M de CM363 durante 2 ( $\bullet$ , $\circ$ ), 6 ( $\blacksquare$ , $\square$ ) o 24 ( $\blacktriangle$ , $\Delta$ ) horas. Transcurrido ese tiempo, se retiró el compuesto y se estudió la proliferación celular (símbolos negros) y la citotoxicidad (símbolos grises) en ausencia de CM363 durante 3 días (sistema Incucyte).

#### 2. CM363 inhibe la transcripción dependiente de STAT5 y STAT3

Las proteínas STAT son factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en el control de la proliferación y supervivencia celular. Su activación constitutiva induce ciertos aspectos propios de la transformación celular (11).

Para estudiar si el CM363 es capaz de inhibir la transcripción dependiente de STAT, se utilizaron dos líneas celulares transfectadas con un elemento reportero de luciferasa cuya expresión depende de STAT: las células HEK-GHR, para el estudio de la transcripción dependiente de STAT5, y las HeLa/STAT3-luc, transfectadas establemente, para el estudio de la transcripción dependiente de STAT3. Los resultados obtenidos en estos experimentos mostraron que CM363 inhibe la transcripción de los genes

reporteros dependientes de STAT5 o STAT3, mientras que no influye en la expresión del gen reportero control no dependiente de los STAT,  $\beta$ -galactosidasa, sugiriendo que el compuesto modula la transcripción de manera selectiva y por lo tanto, no indiscriminada (Figura 5).



**Figura 5.** Las células HEK-GHR y HeLa/STAT3-luc fueron cultivadas en un medio carente de suero para estudiar la transcripción dependiente de STAT5 (•) y STAT3 ( $\blacktriangle$ ). El vector de expresión para la proteína  $\beta$ -galactosidasa ( $\square$ ) se usó para controlar la eficiencia de la transfección y la especificidad de la inhibición. Las células se preincubaron con vehículo o CM363 durante 1 h y, posteriormente, se trataron con GH (para STAT5) u OSM (para STAT3) durante 7 h. Finalmente, se determinó la actividad luciferasa tal como se describe en la sección de Material y Métodos.

### 3. CM363 bloquea el ciclo celular en células CML

Para comprobar si la disminución de la viabilidad celular de las células K562 se asocia con un bloqueo del ciclo celular, se trataron las células con CM363 (0,1 - 1  $\mu$ M) durante diferentes tiempos y se obtuvieron perfiles del ciclo celular y de inducción a la apoptosis.

El CM363 produjo un aumento en el porcentaje de células en fase S y una reducción en los porcentajes de células en las fases G0/G1 y G2/M (Figura 6).



**Figura 6.** Las células K562 fueron cultivadas en presencia de diferentes dosis de CM363 (0,1; 0,5; 1  $\mu$ M) durante 48 horas (A) o de 1  $\mu$ M de CM363 durante 1 - 3 días (B). Posteriormente, se realizaron ensayos de citometría de flujo en los que la población de células (C) se cuantificó como porcentaje de células en las subregiones G0/G1, S y G2/M.

Para conocer el mecanismo de acción del CM363, se estudiaron los cambios inducidos por este compuesto en proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular (112, 113) en las células K562 tratadas con 1  $\mu$ M de CM363 durante distintos tiempos (desde 6 h hasta 48 h) (Figura 7).

El producto CM363 produjo un bloqueo del ciclo celular que se asoció con una disminución en los niveles de expresión de la ciclina B y de Cdc25 a las 48 horas de tratamiento (Figura 7). Además, el CM363 incrementó la fosforilación de Chk-1 y Chk-2, dos quinasas *"checkpoint"*, que inactivan Cdc25 por fosforilación o promoviendo su degradación (112, 114). El nivel de expresión de la fosfatasa Cdc25C, que desempeña un papel crítico en el control G2/M (112), se redujo por la acción del compuesto (Figura 7).



**Figura 7.** Las células K562 fueron cultivadas 6, 12, 24 ó 48 horas en presencia del compuesto CM363 (1  $\mu$ M). Posteriormente, se obtuvieron extractos proteicos totales y se analizaron las proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular mediante ensayos de Western blot realizados con anticuerpos específicos. En estos ensayos la proteína GAPDH se usó como control de carga.

### 4. CM363 induce apoptosis en células CML

Tras observar que el CM363 disminuyó la viabilidad y fue capaz de bloquear el ciclo celular, se planteó conocer si estos acontecimientos se correlacionaban con una activación de la muerte celular por apoptosis.

Los resultados de esos experimentos mostraron que el tratamiento de las células K562 con el CM363 se asocia a un aumento de células anexina V-positivas dependiente del tiempo (Figura 8) y a un incremento del número de núcleos apoptóticos (Figura 9).



**Figura 8.** Las células K562 fueron cultivadas durante 1, 2 ó 3 días en presencia de CM363 (1  $\mu$ M) para determinar la translocación de fosfatidilserina a la superficie celular utilizando la anexina V-FITC.



**Figura 9.** Fotomicrografías de campos representativos de células K562 teñidas con trihidrocloruro de bisbenzimida para evaluar la condensación de cromatina nuclear después del tratamiento durante 24 o 36 horas con CM363 (5  $\mu$ M). \*\*\*P < 0.001 con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).

Además, el CM363 causó una liberación del citocromo C de las mitocondrias (Figura 10A), e indujo la escisión de las caspasas -3, y -9, así como de PARP (*Poli- (ADP-ribose) polymerase*), aunque no modificó el estado inactivo de la caspasa-8 (Figura 10B).



**Figura 10.** Las células K562 fueron cultivadas en presencia de CM363 (5  $\mu$ M) durante 3, 6 ó 12 horas. Posteriormente, se obtuvieron extractos proteicos citosólicos (para el caso del citocromo c (Cyt-c) (A)) y totales (para el caso del PARP y las caspasas (B)) que fueron analizados mediante ensayos de Western blot. En estos ensayos se utilizó la proteína  $\beta$ -actina como control de carga. \*\*\*P < 0.001 y \*P < 0.05 con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).

Se sabe que algunos agentes empleados en quimioterapia promueven la degradación proteosomal de Mcl-1, lo que resulta en una expresión incrementada del  $\gamma$ H2AX, rotura del ADN y apoptosis (27, 115). Teniendo esto en cuenta, se decidió investigar el potencial efecto del producto CM363 sobre la expresión proteica de Mcl-1 y  $\gamma$ H2AX en células K562. Estos experimentos mostraron que 48 h de tratamiento con CM363 (1  $\mu$ M) redujo significativamente la expresión de la proteína antiapoptótica Mcl-1 e incrementó la expresión de  $\gamma$ H2AX (Figura 11).



**Figura 11.** Las células K562 fueron cultivadas durante 6, 12, 24 ó 48 horas en presencia del vehículo o de CM363 (1  $\mu$ M). Posteriormente, se obtuvieron extractos proteicos totales en los que se analizó la expresión proteica de Mcl-1 y  $\gamma$ H2AX mediante ensayos de Western blot. La proteína GAPDH fue usada como control de carga en estos ensayos.

### 5. CM363 inhibe la ruta de señalización Bcr-Abl-STAT5 en las células K562

El sello molecular distintivo de la CML es la presencia de la tirosina quinasa Bcr-Abl constitutivamente activa, la cual es el factor causante de la patofísilogía de la CML.

Para investigar los efectos del CM363 sobre la vía de señalización Bcr-Abl/JAK2/STAT5 en CML, se realizaron una serie de experimentos de dosistiempo en los que las células K562 fueron cultivadas en presencia del vehículo o de CM363. Los resultados obtenidos en estos experimentos mostraron que la exposición de las células K562 a 5 μM de CM363 durante 6 horas inhibió la activación constitutiva de pTyr<sup>177</sup>-Bcrl-Abl (pYBcr-Abl) y de pTyr<sup>694</sup>-STAT5 (pYSTAT5) observada en estas células, siendo el efecto inhibidor sobre Bcrl-Abl debido, principalmente, a una reducción en el contenido de la proteína (Figura 12).



**Figura 12.** Las células K562 se incubaron con vehículo o CM363 (5  $\mu$ M) durante los tiempos indicados (3, 6, 12 horas). A continuación, se obtuvieron extractos proteicos totales que fueron analizados mediante ensayos de Western blot para detectar los niveles fosforilados (pY) y totales de Bcr-Abl (gráfica izquierda), Bcr (gráfica central) y STAT5 (gráfica derecha). La β-actina se usó como control de carga. \*\*\* P < 0.001, \*\* P < 0.01 y \*P < 0.05 con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).

Un hallazgo interesante fue que la inhibición de Bcr-Abl y STAT5 inducida por el CM363 se asoció a una disminución de pTyr<sup>1007/1008</sup>-JAK2 (pYJAK2) y a un aumento de pTyr<sup>416</sup>-Src (pYSrc), causadas principalmente por una disminución y un aumento en los contenidos proteicos respectivos (Figura 13).



**Figura 13.** Las células K562 se incubaron con vehículo o CM363 (5  $\mu$ M) durante los tiempos indicados (3, 6, 12 horas). A continuación, se obtuvieron extractos proteicos totales que fueron analizados mediante ensayos de Western blot para detectar los niveles fosforilados (pY) y totales de JAK2 (gráfica izquierda) y Scr (gráfica derecha). La  $\beta$ -actina se usó como control de carga. \*\*\*P < 0.001, \*\* P < 0.01 y \*P < 0.05 con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).

Para comprobar si el CM363 es capaz de inhibir también de la actividad de STAT5 y STAT3 inducida por citoquinas, se utilizaron tres modelos celulares diferentes. En el primero se emplearon células HEL privadas de suero, estimuladas con EPO (*Erytropoyetin*) (Roche, Mannheim, Germany) durante 5 min y tratadas con CM363 durante diferentes períodos de tiempo y en diferentes dosis. Los resultados obtenidos a partir de este primer modelo experimental mostraron que el producto CM363 inhibió la estimulación de la fosforilación (pY) de STAT5 inducido por la EPO de una manera dependiente del tiempo y de la dosis (Figura 14).



**Figura 14.** Las células HEL fueron cultivadas en un medio carente de suero y en presencia de CM363 (5  $\mu$ M) durante 0 - 3 horas (panel izquierdo) o durante 3 horas en presencia de diferentes dosis del producto (0 – 10  $\mu$ M) (panel derecho). A continuación, las células fueron estimuladas con EPO (10 unidades/ml) durante 5 minutos. Finalmente, se obtuvieron extractos proteicos totales que fueron analizados mediante ensayos de Western blot para detectar los niveles fosforilados (pY) y totales de STAT5. La β-actina se usó como control de carga. \*\*\*P < 0.001 y \*\* P < 0.01 con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).

En el segundo y tercer modelo experimental de inducción por citoquinas, se utilizaron células T47D, una línea de células de adenocarcinoma de mama humano que carece de activación constitutiva de STAT, pero que sí responde al tratamiento con GH e IL-6, con una estimulación específica de la fosforilación de STAT5 o STAT3, respectivamente (116, 117). Las células T47D cultivadas en un medio carente de suero fueron estimuladas con GH (50 nM) durante 10 minutos o con IL6 (25 ng/ml) durante 30 minutos, y tratadas con CM363 durante diferentes tiempos y con distintas dosis. Los resultados obtenidos a partir de estos modelos experimentales mostraron que la exposición de las células a CM363 durante 1 hora fue suficiente para inhibir la pYSTAT5 inducida por GH (Figura 15), así como la pYSTAT3 promovida por IL-6 (*interleukin 6*) (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) (Figura 16).


**Figura 15.** Las células T47D fueron cultivadas en un medio carente de suero y en presencia de CM363 (5  $\mu$ M) durante 0 – 3 horas (panel izquierdo) o durante 1 hora en presencia de diferentes dosis del producto (0 – 10  $\mu$ M) (panel derecho). A continuación, las células fueron estimuladas con GH (50 nM) durante 10 minutos. Finalmente, se obtuvieron extractos proteicos totales que fueron analizados mediante ensayos de Western blot para detectar los niveles fosforilados (pY) y totales de STAT5. La β-actina se usó como control de carga. \*\*\*P < 0.001 con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).



**Figura 16.** Las células T47D fueron cultivadas en un medio carente de suero y en presencia de CM363 (5  $\mu$ M) durante 0 – 3 horas (panel izquierdo) o durante 1 hora en presencia de diferentes dosis del producto (0 – 10  $\mu$ M) (panel derecho). A continuación, las células fueron estimuladas con IL6 (25 ng/ml) durante 30 minutos. Finalmente, se obtuvieron extractos proteicos totales que fueron analizados mediante ensayos de Western blot para detectar los niveles fosforilados (pY) y totales de STAT3. La β-actina se usó como control de carga. \*\*\*P < 0.001 y \*\* P < 0.01 con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).

Además, en estos modelos, y en consonancia con la inhibición de la fosforilación de las STAT, el producto inhibió la unión de STAT5 y STAT3 al ADN inducida por la correspondiente citoquina (Figura 17A y 17B).



**Figura 17.** Las células T47D fueron preincubadas durante 30 minutos con CM363 (5µM) y posteriormente estimuladas con GH (50nM) durante 10 min (A) o IL-6 (25ng/ml) (B) durante 30 min, en un medio carente de suero. A continuación, se prepararon extractos proteicos nucleares en los que se determinó, mediante ensayos de Western blot, los niveles fosforilados y totales de STAT5 (A, panel superior) y STAT3 (B, panel superior), respectivamente. La β-actina se usó como control de carga. Los extractos proteicos nucleares obtenidos a partir de células T47D tratadas con CM363 y GH o IL-6 se utilizaron además para investigar los efectos del producto sobre la unión de STAT5 (A; panel inferior) o STAT3 (B; panel inferior) al ADN usando el kit de ELISA que se describe en la sección de Materiales y Métodos. \*\*\*P < 0.001, \*\*P < 0.01 y \*P < 0.05 con respecto a las células tratadas con GH (A) o IL-6 (B).

Para investigar las consecuencias funcionales del tratamiento con CM363 sobre las células K562, se realizaron ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), en los que se observó que el producto inhibe la expresión de los genes PIM y c-Myc, que son diana de la ruta Bcr-Abl-STAT5 (26) (Figura 18).



**Figura 18.** Las células K562 fueron cultivados durante diferentes tiempos (6 - 32 horas) en presencia de vehículo (VEH), CM363 (3  $\mu$ M) o IM (IM) (1  $\mu$ M). Los niveles de mARN de los genes PIM y Myc (previa síntesis de cADN) fueron analizados mediante qPCR. \*\*\*P < 0.001, \*\*P < 0.01 y \*P < 0.05 con respecto a las células tratadas con VEH.

#### 6. CM363 actúa sobre otras vías de señalización importantes para la supervivencia en CML

La señalización Bcr-Abl también está relacionada con la activación de las vías RAS/RAF/MEK/ERK, JNK y PI3K/AKT/mTOR (26, 48, 118, 119). De manera que, para obtener una visión más amplia sobre los mecanismos que median las acciones del CM363 en CML, se analizó su efecto sobre varias decenas de quinasas y mediadores de señalización relevantes en las células K562. Este análisis se realizó después de exponer las células K562 a 5  $\mu$ M de CM363 durante 6 h. Para ello, se utilizó un kit de "*array*" de fosfoquinasas humanas basado en anticuerpos específicos (Figura 19).



**Figura 19.** Las células K562 fueron incubadas en presencia de vehículo (VEH,  $\Box$ ) o CM363 (5  $\mu$ M, **•**) durante 6 h. A continuación, se obtuvieron extractos proteicos totales que se analizaron usando el kit Human Phospho-Kinase Array tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos. \*\*\*P < 0.001, \*\*P < 0.01 y \*P < 0.05 con respecto a las células tratadas con el VEH.

De todas las proteínas analizadas, sólo algunas fueron modificadas significativamente después del tratamiento con el CM363. Los resultados obtenidos muestran que, por un lado, CM363 inhibió mayoritariamente a fosfoquinasas implicadas en las rutas de señalización de MAPK (p38; ERK1/2), STAT (STAT5b) y del ciclo celular (Chk-2) y que, por otro lado, estimuló la fosforilación de JNK (JNK1/2/3) y AKT [(Ser<sup>473</sup>-AKT1/2/3)].

Los resultados del "*array*" de fosfoquinasas para ERK1/2, p38MAPK y JNK fueron posteriormente validados y ampliados mediante *Western blot*. El tratamiento de las células K562 con el CM363 produjo una inhibición de la fosforilación de ERK1/2 y P38, y una activación evidente (fosforilación) de JNK después de 3 horas de tratamiento con CM363 (5  $\mu$ M). Además, la activación de JNK persiste, al menos, durante 12 horas (Figura 20A). Finalmente, se estudiaron también los efectos moduladores del CM363 sobre los componentes de la vía PI3K/AKT/mTOR. En particular, se observó que el CM363 redujo los niveles de fosforilación de S6 (pS6) (Figura 20B).



Figura 20. Las células K562 fueron incubadas en presencia de vehículo (VEH) o CM363 (5 µM) durante 3, 6 ó 12 horas. A continuación, se obtuvieron extractos proteicos totales que fueron analizados mediante ensayos de Western blot para determinar los niveles fosforilados y totales de (A) ERK1/2, P38-MAPK, JNK y (B) pS6. La β-actina se usó como control de carga. \*\*\*P < 0.001, \*\*P < 0.01 y \*P < 0.05con respecto a las células tratadas con el VEH.

0.25

0.00

VEH 6 12 24 48 VEH 6 12 24 48 1µM CM363

(h)

1µM CM363

(h)

**S6** 

GAPDH

## 7. CM363 actúa sinérgicamente con IM para inhibir la viabilidad celular de CML, eludiendo la resistencia a IM.

Para investigar si una combinación de CM363/IM podría proporcionar una actividad mejorada (sinérgica), se comenzó por estudiar los efectos de esta combinación sobre la fosforilación de STAT5 (pYSTAT5). Los resultados mostraron que la exposición de las células K562, durante 3 horas a 3  $\mu$ M CM363 y 0,05  $\mu$ M IM, por separado, redujo la pYSTAT5 en un 20% y 60%, respectivamente. Sin embargo, cuando las células K562 fueron cultivadas en presencia de una combinación de esas dosis de los dos fármacos, se observó una inhibición casi completa de la pYSTAT5 (Figura 21).



**Figura 21.** Las células K562 fueron cultivadas en presencia de CM363 (3 ó 5  $\mu$ M), IM (0,05 ó 0,1  $\mu$ M) o una combinación de ambos durante 3 horas. Posteriormente, se obtuvieron extractos proteicos totales que fueron usados para analizar los niveles de fosforilación y la expresión proteica total de STAT5 mediante ensayos de Western blot, usando anticuerpos específicos. La  $\beta$ -actina se usó como control de carga.

En segundo lugar, se investigó una potencial acción sinérgica de una combinación de CM363/IM sobre la inhibición de la supervivencia celular. Para ello, se utilizó una combinación de proporción constante de CM363 e IM [ratio 5 (CM363): 1 (IM)]. El análisis de isobolograma y del índice de combinación de Chou-Talalay (110) realizado a partir de estos experimentos determinó que la combinación de CM363 e IM produce una inhibición de la supervivencia celular mayor que la observada con cualquiera de los fármacos utilizados de manera independiente (CI para la Dosis Eficaz 50 (ED50) = 0,4  $\pm$  0,2 y para la Dosis Eficaz 75 (ED75) = 0,6  $\pm$  0,3) (Figura 22).



**Figura 22.** (A) Las células K562 se cultivaron en presencia de CM363 (1, 2  $\mu$ M), IM (0,25  $\mu$ M) o de ambos durante 48 horas, y la supervivencia de las células K562 se analizó mediante el ensayo de MTT (B) La células K562 se cultivaron en presencia de CM363 (8 dosis, de 0 a 5  $\mu$ M), IM (8 dosis, de 0 a 1  $\mu$ M) o de ambos en combinación (combinación de proporción constante (5 (CM363): 1 (IM)) durante 48 horas, después de lo cual se determinó el número de células viables mediante el ensayo de MTT tal como se describe en Materiales y Métodos. El análisis de Isobolograma se realizó basándose en el cambio en el número de células viables para 8 dosis diferentes de CM363 e IM usando el software Calcusyn®, tal como se describe en Materiales y Métodos. <sup>\*\*\*</sup>P < 0.001 con respecto a las células tratadas con el vehículo. <sup>\$</sup>P < 0.01 con respecto a las células tratadas con CM363 o IM.

Para evaluar el alcance de los efectos inhibitorios inducidos por el CM363 sobre la supervivencia celular, se determinó su actividad frente a una línea celular derivada de CML resistente a IM (K562-R) (120). Tanto las células K562-R como las células K562 sensibles a IM se trataron con concentraciones crecientes de CM363 o IM durante 24 - 96 horas para posteriormente realizar el ensayo de MTT. Como cabría esperar, el valor de IC50 para IM fue casi 25 veces mayor en las células K562-R que en las células K562 sensibles a IM. Sin embargo, ambas líneas celulares mostraron una sensibilidad a CM363 equivalente, con valores de IC50 cercanos a 0,6  $\mu$ M para ambos clones (Figura 23A).

La obtención de imágenes a tiempo real de células K562 corroboró que el CM363 causó un efecto citostático tanto en células K562 sensibles a IM (IC50 AUC =  $0,6 \pm 0,3 \mu$ M) como en células K562-R (IC50AUC =  $0,5 \pm 0,1 \mu$ M), a concentraciones inferiores a 1  $\mu$ M. Sorprendentemente, una concentración mayor de CM363 causó un efecto citotóxico en las células K562 sensibles a IM, mientras que en células K562-R el producto se siguió comportando como citostático (Figura 23B).



**Figura 23.** (A) Las células K562 sensibles a IM ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ) y las células K562-R ( $\Lambda$ ,  $\circ$ ) resistentes a IM fueron cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de CM363 ( $\bullet$ ,  $\circ$ ) o IM ( $\bigstar$ ,  $\Lambda$ ) durante 72 horas. A continuación, se determinó viabilidad celular mediante ensayo de MTT tal como se describe en Materiales y Métodos. (B) Se cultivaron células K562 sensibles a IM ( $\bullet$ ,  $\circ$ ) o células de resistentes a IM ( $\bigstar$ ,  $\Lambda$ ) en ausencia (vehículo) o presencia de las concentraciones indicadas de CM363 durante un período de 4 días. Los efectos de CM363 sobre la proliferación celular ( $\bullet$ ,  $\bigstar$ ) y la citotoxicidad ( $\circ$ ,  $\Lambda$ ) fueron estudiados utilizando el sistema de toma de imágenes a tiempo real Incucyte<sup>TM</sup> HD. Los datos se representan como área bajo curva (AUC).

#### 8. CM363 inhibe el crecimiento de xenoinjertos humanos de CML en ratones atímicos

Finalmente, se realizaron experimentos *in vivo* usando modelos de xenoinjertos de células K562 en ratones inmuno-deprimidos (111), para determinar si la administración de CM363 es capaz de suprimir el crecimiento de los tumores inducidos.

En este grupo de experimentos se midió el volumen de los tumores establecidos en ratones. En el grupo control (vehículo), el volumen aumentó de manera constante a lo largo de los 25 días del período de estudio (Figura 24A). Como se esperaba, la administración del compuesto IM (control positivo, 40 mg/kg, vía oral) produjo una reducción pronunciada y estadísticamente significativa (P = 0,039 en el día 4 y P = 0,008 en el día 25, en comparación con el grupo control) del crecimiento tumoral (Figura 24A). La administración de CM363 (10 mg/kg, intraperitoneal) también produjo una reducción pronunciada y estadísticamente significativa (P = 0,004 en el día 4 y P = 0,007 en el día 25 en comparación con el grupo control) del crecimiento tumoral (Figura 24A). Además, también se monitorizó el peso de los animales durante los 25 días de tratamiento como una medida indirecta de la salud de los animales. Tal como se observa en la Figura 24B, el tratamiento con el fármaco CM363 no se asocia con una reducción significativa del peso corporal de los ratones (Figura 24B).



**Figura 24.** Células K562 humanas fueron inoculadas subcutáneamente en los flancos de ratones inmunodeprimidos NOD-SCID tal como se describe en Materiales y Métodos. A continuación, los ratones se dividieron en tres grupos de seis ratones cada uno: vehículo (•) (grupo control), CM363 (10 mg/kg/día; ip) (•) e IM (40 mg/kg/día) (•). Se determinó el volumen de los tumores (A) y el peso corporal de los animales (B), dos veces por semana. La comparación entre el grupo control y los grupos tratados con IM o CM363 se realizó mediante un análisis de ANOVA unidireccional seguido por las pruebas de comparación múltiple de Tukey. \*P < 0.05 y \*\*\*P < 0.001 con respecto a los ratones tratados con el vehículo.

## **Capítulo II**

Evaluación de la actividad antitumoral del compuesto ihf-c6

#### 1. Ihf-c6 reduce la viabilidad de células de leucemia humana

Para estudiar el efecto de los distintos compuestos de la segunda quimioteca sobre la viabilidad celular se utilizó, como para los de la quimioteca anterior, el ensayo para medir metabolización mitocondrial del MTT.

Inicialmente, se realizó un ensayo con una dosis fija de 10  $\mu$ M de los distintos compuestos en 8 líneas celulares de tumores hematológicos y sólidos (Tabla 1).

	HL60 S (10µM)		К562 S (10µМ)		HEL S (10µM)		Raw S (10µM)	
Producto	% inhib	SD	% inhib	SD	% inhib	SD	% inhb	SD
Ihf-c6	96.2	2.8	70.7	5.0	95.5	0.5	101.9	0.5
Ihf-c7	100.4	1.0	64.0	0.3	96.8	1.3	101.7	0.7
Ihf-c1	95.2	0.7	84.7	2.0	95.7	0.8	99.5	0.5
Ihf-c17	95.8	0.3	71.2	8.0	92.5	1.3	99.2	0.3
Ihf-L22	94.5	1.0	67.0	0.3	97.0	1.1	100.9	0.2
Ihf-c20	95.5	0.8	65.2	4.8	86.8	0.6	98.2	0.3
Ihf-L12	92.0	2.0	65.4	4.0	96.4	0.9	100.4	1.4
Ihf-c25	14.3	4.6	0.0	7.6	6.2	9.1	0.0	7.5
Ihf-L13	0.0	6.5	0.0	3.7	2.7	5.8	1.6	4.4
Ihf-L4	7.0	11.1	15.9	2.6	10.3	4.3	9.0	1.4
Ihf-c23	0.0	0.8	0.0	5.6	16.1	6.4	11.3	3.2
Ihf-c11	0.0	1.6	0.1	12.1	5.7	2.7	0.0	14.2
Ihf-L19	0.0	2.7	0.2	10.0	17.3	6.3	15.6	5.2
Ihf-c16	5.6	4.6	0.3	9.7	19.5	5.0	0.0	13.9

	МСF7 S (10µМ)		SKBR3 S (10μM)		L1210 S (10µM)		NCTC3749 S (10μM)	
Producto	% inhib	SD	% inhib	SD	% inhib	SD	% inhb	SD
Ihf-c6	82.9	0.6	47.0	0.4	92.1	1.4	98.2	0.4
Ihf-c7	58.8	0.8	53.5	5.6	39.9	10.4	96.6	0.4
Ihf-c1	90.4	1.7	96.4	1.1	98.9	0.8	96.5	0.6
Ihf-c17	54.5	7.1	50.8	8.9	100.4	0.9	98.0	18.6
Ihf-L22	95.4	1.6	47.2	3.3	38.6	5.4	98.9	0.4
Ihf-c20	94.1	5.8	35.1	0.4	68.5	3.1	95.8	0.6
Ihf-L12	93.8	6.0	59.2	3.5	71.1	4.5	86.9	5.0
Ihf-c25	0.0	0.7	0.0	2.2	27.1	4.8	0.0	4.4
Ihf-L13	0.0	2.7	0.0	6.5	26.1	2.0	0.0	5.3
Ihf-L4	7.7	6.5	0.0	4.2	21.6	10.5	0.0	3.8
Ihf-c23	0.0	5.2	0.0	3.7	16.7	1.3	0.0	3.8
Ihf-c11	0.0	5.3	0.0	2.5	9.8	3.9	0.0	2.5
Ihf-L19	0.0	9.3	0.0	12.2	16.7	10.8	0.0	3.6
Ihf-c16	0.0	7.2	0.0	4.2	9.2	8.1	0.0	8.5

**Tabla 1.** Efecto de una selección de fármacos sobre la viabilidad celular a una dosis de  $10 \mu M$  de ihf-c6 durante 48 horas en distintas líneas celulares mediante el ensayo colorimétrico de la reducción de MTT.

A partir de este ensayo inicial se seleccionaron aquellos fármacos que produjeron una inhibición de la viabilidad igual o superior al 60% en este cribado inicial y se calculó su IC50. Para ello, se sembraron las células tumorales en presencia de distintas concentraciones ( $0.03 - 10\mu$ M) de estos fármacos y se incubaron durante 48 h. Entre todos los fármacos preseleccionados, el ihf-c6 presentó unos valores de IC50 más bajos en las líneas celulares ensayadas, siendo más eficaz en las líneas de leucemia (HL60, MOLM.13, MV4.11, HEL y K562) (Tabla 2).

Línea celular	Mean IC50 (µM)
HL60	0.3 ± 0.1
MOLM.13	$0.5 \pm nd$
MV4.11	$1.1 \pm 1.1$
HEL	$1.3 \pm 0.6$
K562	$1.4 \pm 0.7$
T47D	$2.9 \pm nd$
PC3	$3.2 \pm 1.1$
NCTC 3749	3.4 ± 1.6
L1210	4.7 ± 1.1
HCT-15	4.8 ± 1.4
MCF7	8.3 ± 0.1
SKBR3	$>5 \pm nd$
MRC.5	>5

**Tabla 2.** Efecto de ihf-c6 sobre la viabilidad celular en distintas líneas celulares tumorales mediante el ensayo colorimétrico de la reducción de MTT. Las células se sembraron y trataron con distintas concentraciones ( $0.03 - 10 \mu M$ ) de ihf-c6 durante 48 h (nd: no determinado).

Como se puede apreciar, los valores de IC50 para las células K562 (IC50 =  $1,4 \pm 0,7 \mu$ M), HEL (IC50 =  $1,3 \pm 0,6 \mu$ M) y HL60 (IC50 =  $0,3 \pm 0,1 \mu$ M) fueron seniblemente inferiores a los observados para algunas células no hematológicas (MCF7 =  $8,3 \pm 0,1 \mu$ M) y células no tumorales (MRC-5 >  $5\mu$ M), siendo éstas menos sensibles a la inhibición de la viabilidad celular por ihf-c6 (Figura 1). Estos datos sugieren una selectividad antiproliferativa y una mayor eficacia sobre las células de cáncer hematológico.



**Figura 1.** Células K562 (•), HL60 (•), HEL ( $\blacktriangle$ ) y MRC5 ( $\square$ ) se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes (0,03 - 10  $\mu$ M) de ihf-c6 durante 48 h. Posteriormente, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT.

Para estudiar si el efecto del fármaco ihf-c6 sobre la viabilidad celular se debía a un efecto citotóxico o citostático, se cultivaron células K562 tratadas con distintas concentraciones de ihf-c6 y se monitorizó su crecimiento mediante la toma de imágenes de células vivas a tiempo real. Este grupo de experimentos demostró que ihf-c6 causa un efecto citostático en el crecimiento celular a una concentración próxima a 0,7  $\mu$ M y un efecto citotóxico a una concentración próxima a 1,7  $\mu$ M (Figura 2).



**Figura 2.** Se cultivaron células K562 en presencia de vehículo o de concentraciones crecientes de ihf-c6 (0,03 - 10  $\mu$ M) durante 4 días. Durante ese periodo de tiempo se investigaron los efectos del fármaco sobre la proliferación (•) y la citotoxicidad (•) usando el sistema de análisis a tiempo real Incucyte<sup>TM</sup> HD. Los datos se representan como área bajo la curva (AUC).

### 2. Ihf-c6 inhibe la ruta de señalización Bcr-Abl-STAT5 y JAK2-STAT5/STAT3

Para investigar si el compuesto ihf-c6 es capaz de inhibir la activación constitutiva (fosforilación) de Bcr-Abl-STAT5 y JAK2-STAT5/STAT3, se utilizaron los modelos celulares K562 y HEL. Inicialmente, estas líneas celulares se cultivaron en presencia de una dosis fija 5µM de ihf-c6 durante distintos tiempos. Los resultados de estos experimentos mostraron que este producto (5 µM durante 6 horas) inhibió la activación constitutiva de pYSTAT5 (STAT5 fosforilada en tirosina) y pYBcr-Abl (Bcr-Abl fosforilada en tirosina) (Figura 3), debido, en gran parte, en el caso de Bcr-Abl, a la reducción del contenido de proteína total. Estos experimentos indican, además, que el tratamiento con ihf-c6 también redujo significativamente la

activación constitutiva de pYSTAT3 (STAT3 fosforilada en tirosina) y pYJAK2 (JAK2 fosforilada en tirosina) en las células HEL. Sin embargo, el producto precisa de, al menos, 12 horas para producir un efecto similar obre pYSTAT5 en esta línea celular (Figura 4).



**Figura 3.** Se incubaron células K562 en presencia de vehículo o ihf-c6 (5  $\mu$ M) durante los tiempos indicados (1, 3, 6, 12, 24 h). A continuación, se realizaron ensayos de Western blot con anticuerpos específicos para detectar los niveles fosforilados (pY) y totales de Bcr-Abl (panel izquierdo), Bcr (panel intermedio) y STAT5 (panel derecho). \*\*\*P < 0.001, \*\* P < 0.01 y \*P < 0.05 con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).



**Figura 4.** Se incubaron células HEL en presencia de vehículo o ihf-c6 (5µM) durante los tiempos indicados (1, 3, 6, 12, 24 h). A continuación, se realizaron ensayos de Western blot con anticuerpos específicos para detectar los niveles fosforilados (pY) y totales de JAK2 (panel izquierdo), STAT5 (panel intermedio) y STAT3 (panel derecho). \*\*\*P < 0.001, \*\*P < 0.01 y \*P < 0.05 con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).

En otra serie de experimentos se investigó si el producto es capaz de inhibir la activación de STAT5 y STAT3 inducida por citoquinas. Para ello, se utilizaron células de adenocarcinoma de mama humano T47D, las cuales carecen de activación constitutiva de STAT, pero que sí responden al tratamiento con GH e IL-6 con una estimulación específica de la fosforilación de STAT5 o STAT3, respectivamente (116, 117). En estos experimentos, las células T47D fueron estimuladas con GH (50 nM) durante 10 min o IL-6 (25 ng/ml) durante 30 min, y tratadas durante diferentes tiempos (0 - 3 h) y con

distintas dosis (0 - 3  $\mu$ M) de ihf-c6 para posteriormente determinar la fosforilación de STAT5 o STAT3. Los resultados mostraron que el tratamiento de las células T47D durante 30 minutos con el producto fue suficiente para inhibir significativamente la fosforilación de STAT5 inducida por la GH (Figura 5), y de STAT3 inducida por la IL-6 (Figura 6).



**Figura 5.** Se preincubaron células T47D durante diferentes tiempos (0 - 3 horas) o durante 30 minutos, con una dosis única  $(5\mu M)$  (panel izquierdo) o con diferentes concentraciones  $(0 - 5 \mu M)$  (panel derecho) del producto ihf-c6, respectivamente, en un medio carente de suero. A continuación, las células T47D fueron estimuladas durante 10 minutos con GH (50 nM) y se prepararon extractos proteicos totales para realizar ensayos de Western blot en los que se analizó la fosforilación (pYSTAT5) y la expresión proteica total de STAT5. En la figura se muestran los análisis densitométricos de los niveles fosforilados con respecto a los totales de STAT5. \*\*\*P < 0.001 con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).



**Figura 6.** Se preincubaron células T47D durante diferentes tiempos (0 - 3 horas, con)una dosis única  $(5 \ \mu\text{M})$  (panel izquierdo) o con diferentes concentraciones  $(0 - 5 \ \mu\text{M})$ durante 30 minutos (panel derecho) del producto ihf-c6, en un medio carente de suero. A continuación, las células T47D fueron estimuladas durante 30 minutos con IL-6 (25 ng/ml) y se prepararon extractos proteicos totales para realizar ensayos de Western blot en los que se analizó la fosforilación (pYSTAT3) y la expresión proteica total de STAT3. En la figura se muestran los análisis densitométricos de los niveles fosforilados con respecto a los totales de STAT5. \*\*\*P < 0.001, \*\* P < 0.01 con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).

# 3. Ihf-c6 inhibe la unión de STAT3 y STAT5 a su secuencia diana en el ADN

Las proteínas STAT son factores de transcripción que una vez activadas por fosforilación forman dímeros, atraviesan la membrana nuclear y se unen a la secuencia específica del gen diana, regulando su transcripción (7).

Para evaluar el efecto del ihf-c6 sobre la interacción STAT-ADN se utilizó el mismo kit de ELISA que se empleó en el estudio del CM363. En esos experimentos, las células T47D fueron tratadas con distintas concentraciones del fármaco durante 30 minutos, y, posteriormente, estimuladas con GH (10 min) o IL-6 (30 min). Los resultados indican que el producto ihf-c6 inhibió, de forma dosis dependiente, la unión al ADN de STAT5 (Figura 7A) y STAT3 (Figura 7B) inducidas por sus respectivas citoquinas.



**Figura 7.** Las células T47D fueron preincubadas durante 30 minutos con ihf-c6  $(5\mu M)$  y posteriormente estimuladas con GH (50nM) durante 10 min (A) o IL-6 (25ng/ml) (B) durante 30 min, en un medio carente de suero. A continuación, se prepararon extractos proteicos nucleares en los que se determinó, mediante ensayos de Western blot, los niveles fosforilados y totales de STAT5 (A, panel superior) y STAT3 (B, panel superior), respectivamente. Los extractos proteicos nucleares obtenidos a partir de células T47D tratadas con ihf-c6 y GH / IL-6 se utilizaron además para investigar los efectos del producto sobre la unión de STAT5b (A; panel inferior) o STAT3 (B; panel inferior) al ADN usando el kit de ELISA que se describe en la sección de Materiales y Métodos. \*\*\*P < 0.001, \*\*P < 0.01 y \*P < 0.05 con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH). <sup>\$</sup>P < 0.01 con respecto a las células con GH (A) o IL-6 (B).

#### 4. Ihf-c6 inhibe la transcripción dependiente de STAT5 y STAT3

Para estudiar si el ihf-c6 es capaz de inhibir la transcripción dependiente de STAT, se utilizaron dos líneas celulares transfectadas con un elemento reportero de luciferasa cuya expresión depende de STAT: las células HEK-GHR para el estudio de la transcripción dependiente de STAT5, y las células HeLa/STAT3-luc para el estudio de la transcripción dependiente de STAT3. Los resultados revelan que ihf-c6 inhibió la transcripción de los genes reporteros dependiente de STAT5 con un valor de IC50 de 7,8  $\mu$ M y dependiente de STAT3 con un valor de IC50 de 9,3  $\mu$ M (Figura 8).



**Figura 8.** Las células HEK-GHR y HeLa/STAT3-luc fueron cultivadas en un medio carente de suero para estudiar la transcripción dependiente de STAT5 ( $\bullet$ ) y STAT3 ( $\blacktriangle$ ). Las células se preincuparon con vehículo o ihf-c6 durante 1 h y posteriormente se trataron con GH (para STAT5) u OSM (para STAT3) durante 7 h. Finalmente, se determinó la actividad luciferasa tal como se describe en la sección de Material y Métodos.

### 5. Ihf-c6 reduce la viabilidad de células de CML resistentes a IM K562-R

Para evaluar si el ihf-c6 es capaz de inhibir el crecimiento de células resistentes a IM, se realizaron una serie de experimentos en los que se determinó su actividad frente a la línea celular K562-R, derivada de CML resistente a IM (120). Las células K562-R y las células K562 sensibles a IM se trataron con concentraciones crecientes de ihf-c6 o IM durante 72 h y se analizó su viabilidad mediante ensayo de MTT. Los resultados indican que el IM no reduce la viabilidad de las células K562-R pero sí la de las células K562, con una IC50 de 0,2  $\mu$ M. Hay que resaltar, no obstante, que tanto las células K562 sensibles, como las resistentes, mostraron una alta sensibilidad al ihf-c6, con valores de IC50 cercanos a 2  $\mu$ M y 3  $\mu$ M, respectivamente (Figura 9).



**Figura 9.** Las células K562 sensibles a IM  $(\blacksquare, \bullet)$  y las células K562-R  $(\Box, \circ)$  resistentes a IM se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de ihf-c6  $(\bullet, \circ)$  o IM  $(\blacksquare, \Box)$  durante 72 h. A continuación, se midió viabilidad celular mediante el ensayo de MTT tal como se describe en Materiales y Métodos.

# Discusión

El cáncer es una de las principales enfermedades causantes de tasas elevadas de morbi-mortalidad a nivel global. En los últimos años se han conseguido grandes avances terapéuticos gracias a un mejor conocimiento de la biología molecular de los tumores (2). Sin embargo, la baja selectividad, la toxicidad y el desarrollo de resistencias (33, 37, 54, 55) a ciertos fármacos utilizados hoy en día para el tratamiento de esta enfermedad hacen necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. En ese sentido, los productos naturales resultan ser una fuente interesante de estructuras químicas privilegiadas (60-62). A partir de ellos, se tiene la oportunidad de desarrollar quimiotecas de estructuras análogas para su posterior cribado, con el objetivo de identificar y desarrollar nuevos compuestos bioactivos.

Las NPQ y sus derivados se consideran estructuras químicas privilegiadas para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales (91, 92). De hecho, algunos agentes antitumorales con estructura quinónica han sido usados con éxito para el tratamiento tanto de tumores sólidos (por ejemplo doxorubicina) como de leucemias linfo y mieloblásticas (por ejemplo daunorubicina). Existen evidencias experimentales que demuestran que ciertos derivados de NPQ, como por ejemplo, shikonina y plumbagina, son capaces de provocar la muerte de células de CML con valores de IC50 que se encuentran dentro del rango  $\mu$ M o sub- $\mu$ M (94). Sin embargo, estos estudios no han investigado los potenciales efectos tóxicos de estos productos sobre células no tumorales humanas.

En la presente tesis doctoral se investigaron, *in vitro* e *in vivo*, los potenciales efectos antileucémicos de dos nuevos derivados de NPQ, denominados CM363 e ihf-c6. Estos productos fueron capaces de inhibir el crecimiento de células humanas de cáncer hematológico (K562, HEL, HL60) con valores de IC50 en el rango  $\mu$ M – sub- $\mu$ M y con una mayor eficacia que en otras células de cáncer hematológico y en células de tumores sólidos. Además, también se observó que los fibroblastos no tumorales de pulmón

MRC-5 son menos sensibles a la inhibición de la viabilidad por parte de ambos fármacos y que las células mononucleares de sangre periférica humana PBMC son también menos sensibles a la acción del CM363. Estos resultados sugieren una cierta selectividad de estos compuestos por las células de leucemia sobre otros tipos de tumores y células sanas.

La hiperactivación de la ruta JAK/STAT se asocia con diversos tipos de cáncer (18-23). Un ejemplo descrito es la mutación en el dominio pseudoquinasa JH2 del gen JAK2 (JAK2 V617F), que produce una activación constitutiva de la vía de señalización JAK/STAT y que está presente en diversos cánceres hematológicos (25). Otra activación aberrante de esta ruta de señalización está producida por la onco-quinasa de fusión Bcr-Abl, que activa diversas vías de transducción de señales intracelulares relacionadas con la inhibición de la apotosis, STAT5 entre ellas (26). Esta activación constitutiva por parte de Bcr-Abl es la seña de identidad de CML, promoviendo la supervivencia, la progresión del ciclo celular y la activación de rutas de señalización oncogénica (48, 101, 121, 122). Sin embargo, a pesar de que se ha descrito el papel de las naftoquinonas como antitumorales, también en CML (94, 95), no se ha investigado previamente el efecto potencial de estos compuestos sobre la ruta Bcr-Abl/JAK2/STAT. En el presente trabajo, se ha podido demostrar que ambos derivados de naftoquinonas, CM363 e ihf-c6, fueron capaces de inhibir la ruta constitutivamente activa Bcr-Abl/JAK2/STAT5 en células de CML humana K562, inhibiendo la fosforilación de las quinasas de proteína implicadas.

Actualmente se dispone de distintos compuestos capaces de inhibir las tirosina quinasas JAK (32, 34-36) y Bcr-Abl (50, 51, 53), siendo el IM, un inhibidor de Bcr-Abl, la primera prueba de que los inhibidores de tirosina quinasas son eficientes en el tratamiento del cáncer (53). Sin embargo, el desarrollo de resistencia a los tratamientos con TKI para cánceres dependientes de JAK (33, 36, 37) y Bcr-Abl (54-56) supone un problema que

justifica la búsqueda de nuevos fármacos que actúen de manera aditiva o sinérgica con los ya descritos.

La vía JAK2/STAT5 se encuentra constitutivamente activa en células Bcr-Abl<sup>+</sup>, tanto en células sensibles, como resistentes, a IM (123). Sin embargo, la supresión de JAK2 o STAT5 en células Bcr-Abl<sup>+</sup>, tanto sensibles como resistentes a IM, resulta en una reducción del proceso de formación de colonias y en una estimulación de la apoptosis (124). Por tanto, los inhibidores de JAK2/STAT5 podrían resultar muy útiles en combinación con los inhibidores directos de Bcr-Abl para el tratamiento de la CML, ya que podrían ayudar a vencer la resistencia que normalmente se genera frente a los segundos. Al respecto, cabe destacar que en este trabajo se demuestra que los productos CM363 e ihf-c6 son capaces de reducir la viabilidad en células K562 tanto sensibles como resistentes a IM. Además, los resultados aportados por este estudio también demuestran que la combinación de CM363 con IM fue más efectiva que ambos fármacos individualmente en la reducción de la viabilidad y de la fosforilación de Bcr-Abl/JAK2/STAT5. Estos resultados sugieren que la combinación de CM363 con IM podría suponer una ventaja para eludir la resistencia a TKI, lo que abre la posibilidad de usar CM363 como coadyuvante en la terapéutica de la CML.

Diversos estudios previos han demostrado que los derivados de NPQ inducen apoptosis en células de CML a través de la vía intrínseca dependiente de la mitocondria (94). Por otra parte, se ha observado que la inhibición de la ruta Bcr-Abl/STAT5 induce apoptosis en células CML mediante la inhibición de la transcripción, dependiente de STAT5, de miembros de la familia de proteínas moduladoras de la apoptosis Bcl-2, como por ejemplo la proteína antiapoptótica Mcl-1 (27). Como ya se ha comentado anteriormente, en la presente tesis doctoral se demuestra que CM363 inhibe la vía de señalización Bcr-Abl/STAT5 en las células de CML K562, lo que se asocia con una inhibición de la expresión de Mcl-1 y un incremento de la

liberación de citocromo C de la mitocondria al citoplasma. Además, la activación de la apoptosis mediada por CM363 en células K562 también se observa a través del aumento de la unión de anexina V a fosfatidilserina, la activación de las caspasas 3 y 9, y el corte proteolítico del PARP. Los resultados aportados también demuestran que CM363 no activa la caspasa 8, la cual actúa como iniciadora de la vía extrínseca de la apoptosis. Estos resultados tomados en conjunto sugieren que CM363 activa la vía intrínseca de la apoptosis (125) en células K562 a través, posiblemente, de la inhibición de Bcr-Abl y JAK2, ambas responsables de la fosforilación de STAT5 en estas células.

La señalización dependiente de Bcr-Abl se asocia también con la activación de las rutas RAS/RAF/MEK/ERK, JNK y PI3K/AKT/mTOR (26, 48, 118, 119). De manera general, ERK1/2 ejerce efectos que favorecen la supervivencia y proliferación celular, mientras que JNK y p38MAPK se asocian a efectos proapoptóticos (126). Sin embargo, también se ha observado que la señalización dependiente de p38MAPK puede promover la supervivencia y el crecimiento celular. Por tanto, el papel de p38MAPK en la apoptosis no es universal, sino que depende del tipo celular y de los estímulos recibidos (127). Además, es sabido que la inhibición de ERK1/2 induce apoptosis en células K562 (128). En este trabajo mostramos que CM363 produce un descenso en el nivel de fosforilación de ERK1/2 en células K562, lo que sugiere que este mecanismo podría contribuir a la apoptosis inducida por el compuesto en estas células. La activación de JNK promueve la liberación del citocromo C y la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (126). Además, se ha demostrado que el derivado de NPQ shikonina induce apoptosis en células K562 a través de la activación de JNK (94). En la presente tesis doctoral se demuestra que el compuesto CM363 inhibe la ruta Bcr-Abl/STAT5 y estimula la fosforilación de JNK en las células K562, lo que sugiere que ambos mecanismos podrían estar contribuyendo simultáneamente a la inducción de la apoptosis mediada por el compuesto en las mencionadas células. Por otro lado, en este trabajo se observa que el producto CM363 reduce la fosforilación de S<sup>424</sup>S6, una proteína ribosomal cuya fosforilación depende de Bcr-Abl y de PI3K/mTOR en células Bcr-Abl<sup>+</sup> (129). Finalmente, el producto incrementa la fosforilación en la serina 473 de AKT, fosforilación que ha sido relacionada con la inhibición de la síntesis de proteínas (130). Por tanto, estos resultados sugieren que el mecanismo de acción del producto CM363 en las células K562 podría estar también relacionado, directa o indirectamente, con la inhibición de la síntesis de proteínas.

CM363 bloquea el ciclo celular en células K562, aumentando el porcentaje de células en fase S y disminuyendo el porcentaje de células en fase G0/G1 y G2/M. Este efecto se asocia con cambios en los niveles de expresión y/o fosforilación de proteínas implicadas en el ciclo celular (113, 131, 132). El complejo CDK-1/cyclin B juega un papel fundamental en el inicio de la mitosis en células eucariotas (112, 114) y se activa por la defosforilación de CDK-1 mediada por la fosfatasa Cdc25. A su vez, la actividad de Cdc25 está regulada por Chk1 y Chk2, que la inactivan por fosforilación o promueven su degradación (112, 114). El producto CM363 reduce la expresión de cyclin B y Cdc25 y estimula la fosforilación de Chk1 y Chk2, lo que contribuiría a la inhibición de entrada en mitosis y consecuentemente a la parada del ciclo celular en la fase S.

El producto CM363 reduce la expresión de la proteína antiapoptótica Mcl-1 en células K562. Estudios previos han descrito que algunos agentes quimioterápicos promueven la degradación proteosomal de Mcl-1, lo que a su vez produciría un incremento de la expresión del marcador de daño en el ADN de doble cadena,  $\gamma$ H2AX, y estimulación de la apoptosis (27, 115). Al respecto cabe destacar que el presente trabajo demuestra que el producto CM363 reduce la expresión de Mcl-1 y estimula la expresión de  $\gamma$ H2AX después de 48 h de tratamiento, sugiriendo que las células K562 no son

capaces de reparar los daños en su ADN y superar la parada del ciclo celular, y que por tanto, se produce la activación de la apoptosis.

Finalmente, los resultados obtenidos en los ensayos de eficacia antitumoral *in vivo* indican que el producto CM363 administrado por vía intraperitoneal (10 mg/kg) reduce el crecimiento de los tumores inducidos por células K562 en ratones atímicos.

En resumen, los resultados aportados por la presente tesis doctoral muestran que dos derivados de naftoquinonas, CM363 e ihf-c6, son capaces de inhibir la viabilidad de células tumorales, presentando cierta selectividad para cánceres hematológicos. Esta reducción de la viabilidad se asocia, para ambos compuestos y por primera vez para derivados naftoquinónicos, con la inhibición de la ruta Brc-Abl/JAK2/STAT5, vía de señalización constitutivamente activa en diferentes cánceres hematológicos, como por ejemplo la CML. Para el CM363, la reducción de la viabilidad se asocia, además, con la parada del ciclo celular y la posterior entrada en apoptosis. Este efecto se debe, al menos en parte, a la activación de Chk1 y Chk2, a la inhibición de la expresión y/o actividad de ciclina B y Cdc25, a la reducción de la expresión de Mcl-1 y a la estimulación de la expresión de yH2AX. Ambos compuestos, CM363 e ihf-c6, reducen, con una potencia similar, la viabilidad de células resistentes al IM. El CM363 potencia, además, la actividad antiproliferativa del IM e inhibe el crecimiento de células CML humanas en xenoinjertos de tumores inducidos por células de CML en ratones atímicos. Por tanto, este trabajo aporta evidencias experimentales que sugieren que el desarrollo de nuevos derivados naftoquinónicos puede tener un enorme interés para la terapia farmacológica de las leucemias humanas.
### Conclusiones

- El cribado farmacológico de dos librerías químicas (un total de 292 productos) en líneas tumorales hematológicas y no hematológicas permitió identificar compuestos con una eficacia antitumoral *in vitro* cuya IC50 estaba en el rango submicromolar-micromolar.
- En relación a su naturaleza química, los compuestos con mejor eficacia antitumoral *in vitro* son derivados de naftoquinonas. Particularmente, el CM363 es el resultado de la reacción entre 2-hidroxinaftoquinona, 4formilbenzonitrilo y 3-morfolinociclohex-2-enona y el ihf-c6 es el resultado de la reacción entre 2-hidroxi-1,4-naphthaquinone (lawsona), 4-hidroxicumarina y 3,4-dimetoxibenzaldehído.
- En lo que respecta a su selectividad antitumoral, tanto CM363 como ihfc6 muestran una mayor potencia (IC50) antitumoral sobre cánceres hematológicos frente a los no-hematológicos.
- 4. La eficacia antitumoral *in vitro* de CM363 e ihf-c6 es elevada en líneas tumorales dependientes de la ruta de señalización Bcr-Abl/JAK2/STAT5 como es la Leucemia Mieloide Crónica (K562), y de la ruta de señalización JAK2/STAT5, como es la Eritroleucemia Humana (HEL), inhibiendo su activación. Esto sugiere que, al menos JAK2, Bcr-Abl y STAT5 son dianas moleculares de las que dependen el mecanismo de acción antitumoral de estos productos.
- CM363 e ihf-c6 inhiben la transcripción dependiente de la activación de las vías OSMR-STAT3 (activada por Oncostatin M) y GHR-STAT5 (activada por GH) en modelos celulares de genes reporteros de luciferasa.

- CM363 disminuye los niveles de expresión de mARN de PIM y c-Myc en Leucemia Mieloide Crónica (K562), dos genes con los que la ruta de señalización Bcr-Abl/STAT5 controla el crecimiento tumoral.
- 7. CM363 modula los niveles de fosforilación y/o expresión de otras proteínas relevantes en el crecimiento y supervivencia de las K562. Concretamente, incrementa los niveles de fosforilación en JNK y Src, relevantes en la respuesta al estrés oxidativo o daño en el ADN, inhibe los niveles de fosforilación de p38MAPK y ERK1/2, relevantes en la inducción de la apoptosis, y aumenta S473Akt, una fosforilación asociada a la inhibición de la síntesis de proteínas.
- 8. CM363 provoca parada del ciclo celular en las células K562. Concretamente, la parada del ciclo celular en la fase S se asocia con una disminución en la expresión de Cdc25c, relevante para el inicio de la mitosis en células eucariotas, y un aumento en la expresión de p27, Chk1, Chk2 y γH2AX, relevantes para la regulación del ciclo celular y la entrada en apoptosis.
- 9. CM363 induce apoptosis en las células K562. El incremento de los niveles de citocromo C en el citosol, la activación de las caspasas -3 y -9, el corte proteolítico del PARP, y la disminución del nivel de expresión de Mcl-1, sugieren una activación de muerte celular programa por la vía intrínseca.
- 10. La combinación de dosis submaximales de CM363 con IM, incrementan la potencia antitumoral *in vitro* sobre células K562. Esto permitiría usar dosis inferiores a las establecidas, manteniendo su eficacia antitumoral y permitiría el reposicionamiento del IM en una quimioterapia menos tóxica para el enfermo.

- 11. Tanto el CM363 como el ihf-c6 mantienen una excelente eficacia antitumoral *in vitro* sobre células resistentes al IM. Esto sugiere que tanto el CM363 como el ihf-c6 pueden ser eficaces medidas terapéuticas para tratar la Leucemia Mieloide Crónica resistente al IM.
- Por último, en un modelo de xenoinjerto de Leucemia Mieloide Crónica humana, se demuestra que el CM363 tiene una eficacia antitumoral y una menor toxicidad aparente *in vivo* que el IM.

# Bibliografía

1. WH O. World Health Statistics 2017: Monitoring health for the SDGs 2017. 2017.

2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000 Jan 07;100(1):57-70.

3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 04;144(5):646-74.

4. Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and cancer. Hum Mol Genet. 2001 Apr;10(7):677-85.

5. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. EMBO Rep. 2014 Dec;15(12):1243-53.

6. Baker SJ, Rane SG, Reddy EP. Hematopoietic cytokine receptor signaling. Oncogene. 2007 Oct 15;26(47):6724-37.

7. Harrison DA. The Jak/STAT pathway. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Mar 01;4(3).

8. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. Annu Rev Immunol. 1998;16:293-322.

9. Villarino AV, Kanno Y, Ferdinand JR, O'Shea JJ. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. J Immunol. 2015 Jan 01;194(1):21-7.

10. Min X, Ungureanu D, Maxwell S, Hammaren H, Thibault S, Hillert EK, et al. Structural and Functional Characterization of the JH2 Pseudokinase Domain of JAK Family Tyrosine Kinase 2 (TYK2). J Biol Chem. 2015 Nov 06;290(45):27261-70.

11. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. Oncogene. 2000 May 15;19(21):2474-88.

12. Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. J Immunol. 2007 Mar 1;178(5):2623-9.

 Hoey T, Schindler U. STAT structure and function in signaling. Curr Opin Genet Dev. 1998 Oct;8(5):582-7. 14. Jiang M, Zhang WW, Liu P, Yu W, Liu T, Yu J. Dysregulation of SOCS-Mediated Negative Feedback of Cytokine Signaling in Carcinogenesis and Its Significance in Cancer Treatment. Front Immunol. 2017;8:70.

15. Fernández- Pérez LF-M, Amilcar; Guerra, Borja; Díaz-Chico, Juan C.; Iglesias-Gato, Diego. Growth Hormone Receptor Signaling Pathways and its Negative Regulation by SOCS2. Restricted Growth - Clinical, Genetic and Molecular Aspects2016.

16. Valentino L, Pierre J. JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. Biochem Pharmacol. 2006 Mar 14;71(6):713-21.

17. Linossi EM, Nicholson SE. Kinase inhibition, competitive binding and proteasomal degradation: resolving the molecular function of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. Immunol Rev. 2015 Jul;266(1):123-33.

18. Chikuma S, Kanamori M, Mise-Omata S, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling: Potential immune checkpoint molecules for cancer immunotherapy. Cancer Sci. 2017 Apr;108(4):574-80.

19. Saeidi K. Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics. Critical reviews in oncology/hematology. 2016 Feb;98:375-89.

20. Letellier E, Haan S. SOCS2: physiological and pathological functions. Frontiers in bioscience. 2016 Jan 01;8:189-204.

21. Teofili L, Martini M, Cenci T, Petrucci G, Torti L, Storti S, et al. Different STAT-3 and STAT-5 phosphorylation discriminates among Phnegative chronic myeloproliferative diseases and is independent of the V617F JAK-2 mutation. Blood. 2007 Jul 01;110(1):354-9.

22. Costantino L, Barlocco D. STAT 3 as a target for cancer drug discovery. Curr Med Chem. 2008;15(9):834-43.

23. Hakansson P, Nilsson B, Andersson A, Lassen C, Gullberg U, Fioretos T. Gene expression analysis of BCR/ABL1-dependent transcriptional response reveals enrichment for genes involved in negative feedback regulation. Genes Chromosomes Cancer. 2008 Apr;47(4):267-75.

24. Spano JP, Milano G, Rixe C, Fagard R. JAK/STAT signalling pathway in colorectal cancer: a new biological target with therapeutic implications. Eur J Cancer. 2006 Nov;42(16):2668-70.

25. Quentmeier H, MacLeod RA, Zaborski M, Drexler HG. JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in cell lines derived from myeloproliferative disorders. Leukemia. 2006 Mar;20(3):471-6.

26. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. Nat Rev Cancer. 2005 Mar;5(3):172-83.

27. Aichberger KJ, Mayerhofer M, Krauth MT, Skvara H, Florian S, Sonneck K, et al. Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. Blood. 2005 Apr 15;105(8):3303-11.

28. Wang W, Wang YQ, Meng T, Yi JM, Huan XJ, Ma LP, et al. MCL-1 degradation mediated by JNK activation via MEKK1/TAK1-MKK4 contributes to anticancer activity of new tubulin inhibitor MT189. Mol Cancer Ther. 2014 Jun;13(6):1480-91.

29. Horita M, Andreu EJ, Benito A, Arbona C, Sanz C, Benet I, et al. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. J Exp Med. 2000 Mar 20;191(6):977-84.

30. Seidel HM, Lamb P, Rosen J. Pharmaceutical intervention in the JAK/STAT signaling pathway. Oncogene. 2000 May 15;19(21):2645-56.

31. Lai SY, Johnson FM. Defining the role of the JAK-STAT pathway in head and neck and thoracic malignancies: implications for future therapeutic approaches. Drug Resist Updat. 2010 Jun;13(3):67-78.

32. Thompson JE, Cubbon RM, Cummings RT, Wicker LS, Frankshun R, Cunningham BR, et al. Photochemical preparation of a pyridone containing tetracycle: a Jak protein kinase inhibitor. Bioorg Med Chem Lett. 2002 Apr 22;12(8):1219-23.

33. Buchert M, Burns CJ, Ernst M. Targeting JAK kinase in solid tumors: emerging opportunities and challenges. Oncogene. 2016 Feb 25;35(8):939-51.

34. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA, et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. N Engl J Med. 2010 Sep 16;363(12):1117-27.

35. Wernig G, Kharas MG, Okabe R, Moore SA, Leeman DS, Cullen DE, et al. Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. Cancer Cell. 2008 Apr;13(4):311-20.

36. Quintas-Cardama A, Verstovsek S. Molecular pathways: Jak/STAT pathway: mutations, inhibitors, and resistance. Clin Cancer Res. 2013 Apr 15;19(8):1933-40.

37. Springuel L, Renauld JC, Knoops L. JAK kinase targeting in hematologic malignancies: a sinuous pathway from identification of genetic alterations towards clinical indications. Haematologica. 2015 Oct;100(10):1240-53.

38. Jove R, Dalton W, Sebti S, Yu H, Heller R, Jaroszeski M. Inhibition of stat3 signal transduction for human cancer therapy. Google Patents; 2001.

39. McMurray J, Ren Z, Coleman D, Mandal P, Chen X, Liao W. Inhibitors of signal transduction and activator of transcription 3. Google Patents; 2007.

40. Page BDB, Daniel P.; Gunning, Patrick t. Signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors: a patent review. Expert opinion on therapeutic patents. 2011 2011/01/01;21(1):65-83.

41. Lin TS, Mahajan S, Frank DA. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. Oncogene. 2000 May 15;19(21):2496-504.

42. McNaughton SG, Estévez-Braun A, Jiménez-Alonso S, Gutiérrez-Ravelo A, Fernández-Pérez L, Diaz-Chico BN, inventors; Fused quinonic compounds (PCT/EP2013/065552)2015. 43. Hayakawa F, Sugimoto K, Harada Y, Hashimoto N, Ohi N, Kurahashi S, et al. A novel STAT inhibitor, OPB-31121, has a significant antitumor effect on leukemia with STAT-addictive oncokinases. Blood Cancer J. 2013;3:e166.

44. Liu LJ, Leung KH, Chan DS, Wang YT, Ma DL, Leung CH. Identification of a natural product-like STAT3 dimerization inhibitor by structure-based virtual screening. Cell Death Dis. 2014;5:e1293.

45. Bharadwaj U, Eckols TK, Kolosov M, Kasembeli MM, Adam A, Torres D, et al. Drug-repositioning screening identified piperlongumine as a direct STAT3 inhibitor with potent activity against breast cancer. Oncogene. 2015 Mar 12;34(11):1341-53.

46. Grandis JR, Johnson DE, Leong P. Stat3 decoy oligonucleotides and uses therefor. Google Patents; 2006.

47. Turkson J, Jove R, Palmer JW, Kay H, Yu H. Methods for inhibiting tumor cell proliferation involving platinum complexes. Google Patents; 2008.

48. Warsch W, Walz C, Sexl V. JAK of all trades: JAK2-STAT5 as novel therapeutic targets in BCR-ABL1+ chronic myeloid leukemia. Blood. 2013 Sep 26;122(13):2167-75.

49. Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. Oncogene. 2013 May 23;32(21):2601-13.

50. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. Science. 2000 Sep 15;289(5486):1938-42.

51. Warsch W, Kollmann K, Eckelhart E, Fajmann S, Cerny-Reiterer S, Holbl A, et al. High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. Blood. 2011 Mar 24;117(12):3409-20.

52. Wang Y, Fiskus W, Chong DG, Buckley KM, Natarajan K, Rao R, et al. Cotreatment with panobinostat and JAK2 inhibitor TG101209 attenuates JAK2V617F levels and signaling and exerts synergistic cytotoxic

effects against human myeloproliferative neoplastic cells. Blood. 2009 Dec 03;114(24):5024-33.

53. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2001 Apr 05;344(14):1031-7.

54. Rosenzweig SA. Acquired resistance to drugs targeting receptor tyrosine kinases. Biochem Pharmacol. 2012 Apr 15;83(8):1041-8.

55. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. Lancet Oncol. 2007 Nov;8(11):1018-29.

56. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J. Imatinib and beyond-exploring the full potential of targeted therapy for CML. Nat Rev Clin Oncol. 2009 Sep;6(9):535-43.

57. Bixby D, Talpaz M. Seeking the causes and solutions to imatinibresistance in chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2011 Jan;25(1):7-22.

58. Nelson EA, Walker SR, Weisberg E, Bar-Natan M, Barrett R, Gashin LB, et al. The STAT5 inhibitor pimozide decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors. Blood. 2011 Mar 24;117(12):3421-9.

59. Langdon SR, Brown N, Blagg J. Scaffold diversity of exemplified medicinal chemistry space. J Chem Inf Model. 2011 Sep 26;51(9):2174-85.

60. Koch MA, Schuffenhauer A, Scheck M, Wetzel S, Casaulta M, Odermatt A, et al. Charting biologically relevant chemical space: a structural classification of natural products (SCONP). Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 29;102(48):17272-7.

61. Kinghorn AD, Pan L, Fletcher JN, Chai H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. J Nat Prod. 2011 Jun 24;74(6):1539-55.

62. Lachance H, Wetzel S, Kumar K, Waldmann H. Charting, navigating, and populating natural product chemical space for drug discovery. J Med Chem. 2012 Jul 12;55(13):5989-6001.

136

63. Basu S, Ellinger B, Rizzo S, Deraeve C, Schurmann M, Preut H, et al. Biology-oriented synthesis of a natural-product inspired oxepane collection yields a small-molecule activator of the Wnt-pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Apr 26;108(17):6805-10.

64. Schreiber SL. Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. Science. 2000 Mar 17;287(5460):1964-9.

65. Schreiber SL. Organic chemistry: Molecular diversity by design. Nature. 2009 Jan 08;457(7226):153-4.

66. Oh S, Park SB. A design strategy for drug-like polyheterocycles with privileged substructures for discovery of specific small-molecule modulators. Chem Commun (Camb). 2011 Dec 28;47(48):12754-61.

67. Mironov MA. Design of Multi-Component Reactions: From Libraries of Compounds to Libraries of Reactions. QSAR Combinatorial Science. 2006;25:423-31.

68. Zhu JB, H. . Multicomponent reactions

In: Weinheim W-V, editor.2005.

69. Tietze LF. Domino Reactions in Organic Synthesis. Chem Rev. 1996 Feb 01;96(1):115-36.

70. Rotstein BH, Zaretsky S, Rai V, Yudin AK. Small heterocycles in multicomponent reactions. Chem Rev. 2014 Aug 27;114(16):8323-59.

71. Domling A, Wang W, Wang K. Chemistry and biology of multicomponent reactions. Chem Rev. 2012 Jun 13;112(6):3083-135.

72. Ruijter E, Orru RV. Multicomponent reactions - opportunities for the pharmaceutical industry. Drug Discov Today Technol. 2013 Spring;10(1):e15-20.

73. Granger BA, Kaneda K, Martin SF. Libraries of 2,3,4,6,7,11bhexahydro-1H-pyrido[2,1-a]isoquinolin-2-amine derivatives via a multicomponent assembly process/1,3-dipolar cycloaddition strategy. ACS Comb Sci. 2012 Jan 09;14(1):75-9. 74. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. Chem Rev. 2009 Jul;109(7):3012-43.

Zheng W, Thorne N, McKew JC. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. Drug Discov Today. 2013 Nov;18(21-22):1067-73.

76. Wagner BK, Schreiber SL. The Power of Sophisticated Phenotypic Screening and Modern Mechanism-of-Action Methods. Cell chemical biology. 2016 Jan 21;23(1):3-9.

77. Moffat JG, Rudolph J, Bailey D. Phenotypic screening in cancer drug discovery - past, present and future. Nat Rev Drug Discov. 2014 Aug;13(8):588-602.

78. Zoete V, Grosdidier A, Michielin O. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. J Cell Mol Med. 2009 Feb;13(2):238-48.

79. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J Nat Prod. 2003 Jul;66(7):1022-37.

80. Baker DD, Chu M, Oza U, Rajgarhia V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. Natural product reports. 2007 Dec;24(6):1225-44.

81. Sarkar FH, Adsule S, Padhye S, Kulkarni S, Li Y. The role of genistein and synthetic derivatives of isoflavone in cancer prevention and therapy. Mini Rev Med Chem. 2006 Apr;6(4):401-7.

82. Luckey MA, Kimura MY, Waickman AT, Feigenbaum L, Singer A, Park JH. The transcription factor ThPOK suppresses Runx3 and imposes CD4(+) lineage fate by inducing the SOCS suppressors of cytokine signaling. Nat Immunol. 2014 Jul;15(7):638-45.

83. Madoux F, Koenig M, Sessions H, Nelson E, Mercer BA, Cameron M, et al. Modulators of STAT Transcription Factors for the Targeted Therapy of Cancer (STAT3 Inhibitors). Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program. Bethesda (MD)2010.

84. Madoux F, Koenig M, Nelson E, Chowdhury S, Cameron M, Mercer B, et al. Modulators of STAT Transcription Factors for the Targeted Therapy of Cancer (STAT3 Activators). Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program. Bethesda (MD)2010.

85. Quintas-Cardama A, Verstovsek S. New JAK2 inhibitors for myeloproliferative neoplasms. Expert Opin Investig Drugs. 2011 Jul;20(7):961-72.

86. Furqan M, Akinleye A, Mukhi N, Mittal V, Chen Y, Liu D. STAT inhibitors for cancer therapy. J Hematol Oncol. 2013;6:90.

87. O'Sullivan JM, Harrison CN. JAK-STAT signaling in the therapeutic landscape of myeloproliferative neoplasms. Mol Cell Endocrinol. 2017 Feb 03.

88. Meyer T, Vinkemeier U. STAT nuclear translocation: potential for pharmacological intervention. Expert Opin Ther Targets. 2007 Oct;11(10):1355-65.

89. Wong CC, Cheng KW, Rigas B. Preclinical predictors of anticancer drug efficacy: critical assessment with emphasis on whether nanomolar potency should be required of candidate agents. J Pharmacol Exp Ther. 2012 Jun;341(3):572-8.

90. Lorenzo Fernández PMG, Alfonso; Leza Cerro, Juan Carlos; Lizasoain Hernández, Ignacio; Moro Sánchez, María Ángeles; Portolés Pérez, Antonio. Velázquez: Manual de Farmacología Básica y Clínica. Panamericana EM, editor2012.

91. Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, Cho AK. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2012;52:221-47.

92. Wellington KW. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones - a review. RSC Advances. 2015;5:20309–38.

93. Fila C, Metz C, van der Sluijs P. Juglone inactivates cysteine-rich proteins required for progression through mitosis. J Biol Chem. 2008 Aug 01;283(31):21714-24.

94. Mao X, Yu CR, Li WH, Li WX. Induction of apoptosis by shikonin through a ROS/JNK-mediated process in Bcr/Abl-positive chronic myelogenous leukemia (CML) cells. Cell Res. 2008 Aug;18(8):879-88.

95. Sun J, McKallip RJ. Plumbagin treatment leads to apoptosis in human K562 leukemia cells through increased ROS and elevated TRAIL receptor expression. Leuk Res. 2011 Oct;35(10):1402-8.

96. Hsu YL, Cho CY, Kuo PL, Huang YT, Lin CC. Plumbagin (5hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) induces apoptosis and cell cycle arrest in A549 cells through p53 accumulation via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated phosphorylation at serine 15 in vitro and in vivo. J Pharmacol Exp Ther. 2006 Aug;318(2):484-94.

97. Vidal OM, Merino R, Rico-Bautista E, Fernandez-Perez L, Chia DJ, Woelfle J, et al. In vivo transcript profiling and phylogenetic analysis identifies suppressor of cytokine signaling 2 as a direct signal transducer and activator of transcription 5b target in liver. Mol Endocrinol. 2007 Jan;21(1):293-311.

98. Hueso Falcón I. Obtención de quimiotecas con potencial actividad antiinflamatoria y/o antitumoral, a partir de estructuras privilegiadas de origen natural. San Cristóbal de La Laguna: La Laguna; 2013.

99. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

100. Rainaldi G, Calcabrini A, Santini MT. Positively charged polymer polylysine-induced cell adhesion molecule redistribution in K562 cells. J Mater Sci Mater Med. 1998 Dec;9(12):755-60.

101. Schafranek L, Nievergall E, Powell JA, Hiwase DK, Leclercq T, Hughes TP, et al. Sustained inhibition of STAT5, but not JAK2, is essential for TKI-induced cell death in chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2015 Jan;29(1):76-85.

102. Fernandez L, Flores-Morales A, Lahuna O, Sliva D, Norstedt G, Haldosen LA, et al. Desensitization of the growth hormone-induced Janus

kinase 2 (Jak 2)/signal transducer and activator of transcription 5 (Stat5)signaling pathway requires protein synthesis and phospholipase C. Endocrinology. 1998 Apr;139(4):1815-24.

103. Maamra M, Finidori J, Von Laue S, Simon S, Justice S, Webster J, et al. Studies with a growth hormone antagonist and dual-fluorescent confocal microscopy demonstrate that the full-length human growth hormone receptor, but not the truncated isoform, is very rapidly internalized independent of Jak2-Stat5 signaling. J Biol Chem. 1999 May 21;274(21):14791-8.

104. Stephens JM, Lumpkin SJ, Fishman JB. Activation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 by leukemia inhibitory factor, oncostatin-M, and interferon-gamma in adipocytes. J Biol Chem. 1998 Nov 20;273(47):31408-16.

105. Sanchez-Sanchez B, Gutierrez-Herrero S, Lopez-Ruano G, Prieto-Bermejo R, Romo-Gonzalez M, Llanillo M, et al. NADPH oxidases as therapeutic targets in chronic myelogenous leukemia. Clin Cancer Res. 2014 Aug 1;20(15):4014-25.

106. Guerra B, Olmedillas H, Guadalupe-Grau A, Ponce-Gonzalez JG, Morales-Alamo D, Fuentes T, et al. Is sprint exercise a leptin signaling mimetic in human skeletal muscle? J Appl Physiol (1985). 2011 Sep;111(3):715-25.

107. Fernandez-Perez L, Santana-Farre R, de Mirecki-Garrido M, Garcia I, Guerra B, Mateo-Diaz C, et al. Lipid profiling and transcriptomic analysis reveals a functional interplay between estradiol and growth hormone in liver. PLoS One. 2014;9(5):e96305.

108. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45.

109. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol. 2000;132:365-86.

110. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Res. 2010 Jan 15;70(2):440-6.

111. Ocio EM, Maiso P, Chen X, Garayoa M, Alvarez-Fernandez S, San-Segundo L, et al. Zalypsis: a novel marine-derived compound with potent antimyeloma activity that reveals high sensitivity of malignant plasma cells to DNA double-strand breaks. Blood. 2009 Apr 16;113(16):3781-91.

112. Kawabe T, Suganuma M, Ando T, Kimura M, Hori H, Okamoto T. Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition. Oncogene. 2002 Mar 7;21(11):1717-26.

113. Dai Y, Grant S. New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. Clin Cancer Res. 2010 Jan 15;16(2):376-83.

114. Brenner AK, Reikvam H, Lavecchia A, Bruserud O. Therapeutic targeting the cell division cycle 25 (CDC25) phosphatases in human acute myeloid leukemia--the possibility to target several kinases through inhibition of the various CDC25 isoforms. Molecules. 2014;19(11):18414-47.

115. Belmar J, Fesik SW. Small molecule Mcl-1 inhibitors for the treatment of cancer. Pharmacol Ther. 2015 Jan;145:76-84.

116. Shiu RP, Paterson JA. Alteration of cell shape, adhesion, and lipid accumulation in human breast cancer cells (T-47D) by human prolactin and growth hormone. Cancer Res. 1984 Mar;44(3):1178-86.

117. Badache A, Hynes NE. Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop, increases migration of T47D breast cancer cells. Cancer Res. 2001 Jan 1;61(1):383-91.

118. Hantschel O, Warsch W, Eckelhart E, Kaupe I, Grebien F, Wagner KU, et al. BCR-ABL uncouples canonical JAK2-STAT5 signaling in chronic myeloid leukemia. Nat Chem Biol. 2012 Mar;8(3):285-93.

119. Markova B, Albers C, Breitenbuecher F, Melo JV, Brummendorf TH, Heidel F, et al. Novel pathway in Bcr-Abl signal transduction involves Akt-independent, PLC-gamma1-driven activation of mTOR/p70S6-kinase pathway. Oncogene. 2010 Feb 4;29(5):739-51.

120. Aceves-Luquero CI, Agarwal A, Callejas-Valera JL, Arias-Gonzalez L, Esparis-Ogando A, del Peso Ovalle L, et al. ERK2, but not ERK1, mediates acquired and "de novo" resistance to imatinib mesylate: implication for CML therapy. PLoS One. 2009 Jul 01;4(7):e6124.

121. Barrio S, Gallardo M, Arenas A, Ayala R, Rapado I, Rueda D, et al. Inhibition of related JAK/STAT pathways with molecular targeted drugs shows strong synergy with ruxolitinib in chronic myeloproliferative neoplasm. Br J Haematol. 2013 Jun;161(5):667-76.

122. Berger A, Sexl V, Valent P, Moriggl R. Inhibition of STAT5: a therapeutic option in BCR-ABL1-driven leukemia. Oncotarget. 2014 Oct 30;5(20):9564-76.

123. Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. Cancer Control. 2009 Apr;16(2):122-31.

124. Samanta A, Perazzona B, Chakraborty S, Sun X, Modi H, Bhatia R, et al. Janus kinase 2 regulates Bcr-Abl signaling in chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2011 Mar;25(3):463-72.

125. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 May;8(5):405-13.

126. Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. Exp Cell Res. 2000 Apr 10;256(1):34-41.

127. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell Res. 2005 Jan;15(1):11-8.

128. Xiao RZ, He CM, Xiong MJ, Ruan XX, Wang LL, Chen Y, et al. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity by sorafenib increases sensitivity to DNR in K562 cells. Oncol Rep. 2013 May;29(5):1895-901.

129. Ly C, Arechiga AF, Melo JV, Walsh CM, Ong ST. Bcr-Abl kinase modulates the translation regulators ribosomal protein S6 and 4E-BP1 in

chronic myelogenous leukemia cells via the mammalian target of rapamycin. Cancer Res. 2003 Sep 15;63(18):5716-22.

130. Dai CL, Shi J, Chen Y, Iqbal K, Liu F, Gong CX. Inhibition of protein synthesis alters protein degradation through activation of protein kinase B (AKT). J Biol Chem. 2013 Aug 16;288(33):23875-83.

131. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. Cell.2004 Jan 23;116(2):205-19.

132. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. Oncogene. 2007 Dec 10;26(56):7773-9.

### Anexo I. Financiación

El presente proyecto de Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación concedida por:

- Proyectos nacionales competitivos:
  - SAF2015-65113-C2-2. Proyecto coordinado con el Instituto Universitario de Biorgánica (IUBO - Grupo de Investigación QUIBIONAT) de la Universidad de La Laguna. Financiado por el Ministerio Español de Economía y Competitividad (MINECO) y co-financiado por el Fondo Europeo para el Desarrollo Regional (FEDER), en activo.
  - SAF2012-37344-C03-02 y SAF2009-13296-C02-02. Proyectos coordinados con el Instituto Universitario de Biorgánica (IUBO Grupo de Investigación QUIBIONAT) de la Universidad de La Laguna. Financiados por el Ministerio Español de Ciencia e Innovación (MICINN) y co-financiado por el Fondo Europeo para el Desarrollo Regional (FEDER).
- Convenios de colaboración:
  - ULPGC y el Centro Atlántico del Medicamento S.A. (CEAMED, S.A). Proyecto CDTI (IDI 2011 1517- 57579).
  - Fundación "Alfredo Martín Reyes" (Arehucas) y la Fundación del Instituto Canario de Investigación del Cáncer (FICIC).

### • Becas y ayudas

- Ayuda del Programa Propio de la ULPGC para contrato Predoctoral para personal investigador en formación. Convocatoria 2013, en activo.
- Contrato de Investigación del cáncer de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI) - Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC), Convocatoria 2010.
- Ayuda del Programa Innova Canarias 2020<sup>®</sup> para material fungible. Convocatoria 2011.

# **Anexo II. Agradecimientos**

Creí que sería fácil escribir este apartado de la Tesis pero ahora me doy cuenta de que no es así. Me preocupa olvidarme de alguien porque considero que son muchas las personas a las que tengo que agradecer y dedicar este trabajo. Algunas por participar directamente, otras por influir y ayudar de alguna manera a que haya podido conseguir mi objetivo.

A mis directores de Tesis (por orden alfabético) Borja, Juan Carlos y Leandro, por su trabajo y dedicación. Borja, por el tiempo compartido dentro y fuera del laboratorio. Juan Carlos, por nuestras conversaciones, casi nunca sobre ciencia.

A los compañeros de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, especialmente al Dr. José Luis Martín Barrasa y Dr. Norberto Santana, por dejarme entrar en el mundo de la investigación, por pura casualidad y sin haber siquiera terminado la carrera, y hacerme ver que esto es lo que me gusta. Al Dr. Alfredo Santana, por su paciencia y ayuda.

A la empresa Centro Atlántico del Medicamento (Ceamed, S.A.), por brindarme mi primera oportunidad laboral y por ser parte responsable de este trabajo. Al Dr. Nicolás Díaz Chico (Nico), por confiar en mí.

A los compañeros del Instituto de Bio-Orgánica Antonio González, (IUBO, Universidad de la Laguna), Centro de Investigación del Cáncer (CSIC, Universidad de Salamanca) e Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (CSIC, Universidad de Cantabria), por formar parte de este trabajo, entre muchos otros.

A los compañeros del departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología de la ULPGC, especialmente al Dr. José Quintana (Pepe), por tu ayuda, tu inagotable paciencia y tu predisposición, sin una sola mala cara. A los compañeros del grupo de investigación liderado por el Dr. Antonio Castrillo, por salvarme la vida en momentos de desesperación (imprevistos propios de un laboratorio: reactivos que desaparecen o creemos inagotables o una rebelión inoportuna de las máquinas). El duende...

A todos mis compañeros que se han ido buscando otras oportunidades (por orden alfabético): Ainara, Carlos, Cristina B., Dioni, Irene, José, Julia, Laura L., Mercedes, Nico, Noelia, Raquel, Rober, Ruymán, Susana, Teresa. Espero no olvidarme de nadie. Carlos, Rober, por haber sido unos compañeros de laboratorio excelentes.

A los que seguimos por el Edificio Nuevo/CULP y con los que comparto cafés, almuerzos y alguna que otra actividad extraescolar (y con algunas, además, laboratorio), por orden alfabético: Ana E., Ana R., Cris R., Dácil, Esther, Haidée (autora del dibujo de la portada de este trabajo), Henoc, Laura P., Laura R., María, Merci, Moisés, Noelia, Romi, Rosa, Sara, Vladi, Yeray. Si no fuera por esos ratitos...

A mis chiquillas, de nuevo por orden alfabético, Bea, Pris y Yai, por tantos años compartidos, por estar siempre ahí. Por nuestro empeño en arreglar el mundo. A mis queridas amigas chicharreras y de otros lugares, pero que conocí en mi etapa lagunera: Bea (Bio), Carmen, Guada, Kity, Laura, Rocío y Yaji. Podría nombrar a muchas más personas pero no acabaría. Por ser mi familia en La Laguna (y también por la fiesta, por qué negarlo).

A los amigotes, por nuestros asaderos, *banana's parties*, nuestras fiestas sin motivo aparente (donde misteriosamente acabamos comprando pasajes para algún sitio) y demás actividades lúdicas. Aunque ya se va notando la edad.

A Lidia y Aurelio, por cuidar de mi hija y hacer que vaya a trabajar con toda la tranquilidad, sabiendo que no podría estar mejor en ningún otro sitio.

A mis padres y hermana, y a mi abuela, que ya no está con nosotros, por apoyarme sin cuestionar nada. Por estar siempre. También por su ayuda inestimable en el cuidado de mi hija, extendiendo mi agradecimiento a Marco. Mamá, como siempre dices, el que siembra recoge. Ésta es mi cosecha, obtenida con la ayuda de todos.

A Aday, por respetar mi trabajo, aunque a veces suponga sacrificar tiempo juntos, y ahora, en familia. Por aceptar y adaptarte a situaciones adversas. Por acompañarme al laboratorio en horas intempestivas (con alguna queja, como no). Por asumir toda la responsabilidad en todos los aspectos de nuestra vida durante los últimos meses. Por ser mi compañero de viaje y hacerme feliz.

### A TODOS, GRACIAS.

# Anexo III. Información complementaria

### Technical Data Sheet **FITC Annexin V**

Product Information	
Material Number:	556419
Size:	200 tests
Vol. per Test:	5 µl
Storage Buffer:	Aqueous buffered solution containing BSA and $\leq 0.09\%$ sodium azide.

#### Description

Apoptosis is a normal physiologic process which occurs during embryonic development as well as in maintenence of tissue homeostasis. The apoptotic program is characterized by certain morphologic features, including loss of plasma membrane asymmetry and attachment, condensation of the cytoplasm and nucleus, and internucleosomal cleavage of DNA. Loss of plasma membrane is one of the earliest features. In apoptotic cells, the membrane phospholipid phosphatidylserine (PS) is translocated from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane, thereby exposing PS to the external cellular environment. Annexin V is a 35-36 kDa Ca2+ dependent phospholipid-binding protein that has a high affinity for PS, and binds to cells with exposed PS. Annexin V may be conjugated to fluorochromes including FITC. This format retains its high affinity for PS and thus serves as a sensitive probe for flow cytometric analysis of cells that are undergoing apoptosis. Since externalization of PS occurs in the earlier stages of apoptosis, FITC Annexin V staining can identify apoptosis at an earlier stage than assays based on nuclear changes such as DNA fragmentation.

FITC Annexin V staining precedes the loss of membrane integrity which accompanies the latest stages of cell death resulting from either apoptotic or necrotic processes. Therefore, staining with FITC Annexin V is typically used in conjunction with a vital dye such as propidium iodide (PI) or 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) to allow the investigator to identify early apoptotic cells (PI negative, FITC Annexin V positive). Viable cells with intact membranes exclude PI, whereas the membranes of dead and damaged cells are permeable to PI. For example, cells that are considered viable are both FITC Annexin V and PI negative while cells that are in early apoptosis are FITC Annexin V positive and PI negative, while cells that are in late apoptosis or already dead are both FITC Annexin V and PI positive. This assay does not distinguish between cells that have undergone apoptotic death versus those that have died as a result of a necrotic pathway because in either case, the dead cells will stain with both FITC Annexin V and PI. However, when apoptosis is measured over time, cells can be often tracked from FITC Annexin V and PI negative (viable, or no measurable apoptosis), to FITC Annexin V positive and PI negative (early apoptosis, membrane integrity is present) and finally to FITC Annexin V and PI positive (end stage apoptosis and death). The movement of cells through these three stages suggests apoptosis. In contrast, a single observation indicating that cells are both FITC Annexin V and PI positive, in of itself, reveals less information about the process by which the cells underwent their demise.

FITC Annexin V is routinely tested by flow cytometric analysis. Other applications were tested at BD Biosciences Pharmingen during antibody development only or reported in the literature.

#### **BD Biosciences**

bdbiosciences.com United States Canada Furon Asia Pacific Latin America/Caribbean 888.259.0187 32.53.720.550 0120.8555.90 65.6861.0633 877.232.8995 55.11.5185.9995 For country-specific contact information, visit bdbiosciences.com/how\_to\_order/ Conditions: The information disclosed herein is not to be construed as a recommendation to use the above product in violation Conditions: The information disclosed nervin is not to be construed as a recommendation to use the above product in violation of any patents. BB discriences will not be held responsible for patent infringement or other violations that may occur with the use of our product. Purchase does not include or carry any right to resell or transfer this product either as a stand-alone product or as a component of another product. Any use of this product other than the permitted use without the express written authorization of Becton Dickinson and Company is strictly prohibited. For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for resale. BD, BD Logo and all other trademarks are the property of Becton, Dickinson and Company. ©2008 BD



FITC Annexin V: A tool for identifying cells that are undergoing apoptosis. HBP-ALL human leukemia cells were left untrasted (top left & bottom left panels), treated for 5 hr (top middle & bottom middle panels) or 12 hr (top right & bottom right panels) with anti-human Fas antibody (Clone DX2, Cat. No. 555670) and Protein G. Cells were incluated with FITC Annexin V in a buffer containing propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry. Untreated cells were primarily FITC Annexin V and PI negative, indicating that they were viable and not undergoing apoptosis. After a 5 hr treatment with DX2, the majority of the cells were either undergoing apoptosis (FITC Annexin V positive and PI negative) or had already died (FITC Annexin V and PI positive). After a 12 hr treatment with DX2, the majority of the cells had already died (FITC Annexin V and PI positive). The addition of Protein G enhances the ability of DX2 to induce apoptosis, presumably by cross-linking the Fas receptor.

#### Preparation and Storage

Store undiluted at 4°C and protected from prolonged exposure to light. Do not freeze.

#### Application Notes

Application

Flow cytometry	Routinely Tested

#### Recommended Assay Procedure:

FITC Annexin V is a sensitive probe for identifying apoptotic cells, binding to negatively charged phospholipid surfaces (Kd of ~5 x 10e-2) with a higher affinity for phosphatidylserine (PS) than most other phospholipids. FITC Annexin V binding is calcium dependent and defined calcium and salt concentrations are required for optimal staining as described in the FITC Annexin V Staining Protocol. **Investigators should note that FITC Annexin V flow cytometric analysis on adherent cell types (e.g HeLa, NIH 3T3, etc.) is not routinely tested as specific membrane damage may occur during cell detachment or harvesting. Methods for utilizing Annexin V for flow cytometry on adherent cell types, however, have been previously reported (Casiola-Rosen et al. and van Engelend et al.).** 

#### INDUCTION OF APOPTOSIS USING AN ANTI-HUMAN CD95 (FAS) ANTIBODY

The following protocol is provided as an illustration on how FITC Annexin V may be used on a human cell line.

#### Materials

1. A cell line or primary cells that can easily be induced to undergo apoptosis by human Fas mAb. Examples include Daudi lymphoma cells (ATCC CCL-213) and Jurkat T cells (ATCC TIB-152). It is important to note that there can be significant variation between cell lines regarding the level of apoptosis that can be induced through the Fas receptor. Also, not all cell types which express the Fas antigen will necessarily undergo Fas-mediated apoptosis. The cell lines mentioned above are good positive controls as they are strongly induced to undergo apoptosis by Fas mAb. 2. Anti-human CD95 (Fas) mAb, clone DX2 (Cat. No. 555670).

3. Recombinant Protein G (Sigma-Aldrich cat.no. P4689). We have found that the addition of Protein G to the tissue culture medium can
significantly enhance the efficiency of the DX2 clone to induce apoptosis.

4. T25 tissue culture flasks.

5. IMDM or RPMI 1640 medium with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine and 1% antibiotics (penicillin/ streptomycin; 100 U/ml). This supplemented medium is simply referred to as 'medium' below.

#### Procedure

1. Maintain the cells in culture and change the medium one day before inducing apoptosis.

2. Induction of apoptosis: Add 0.5 - 2 µg/ml of the anti-CD95 antibody (DX2 clone) and 1-2 µg/ml Protein G to a T25 flask with medium

containing  $\sim 0.5 \times 10e6$  cells/ml. Negative controls should consist of:

(a)  $\sim 0.5 \times 10e6$  cells/ml with medium alone (no mAb or Protein G), and

(b) ~0.5  $\times$  10e6 cells/ml with medium and 1 µg/ml Protein G alone (no mAb).

3. Incubate the cells for 2 to 12 hr at  $37^\circ C$ 

4. Proceed with the FITC Annexin V Staining Protocol to measure apoptosis. Apoptosis can also be observed by light microscopy, gel electrophoresis (DNA fragmentation ladders) or by using a DNA fragmentation-based flow cytometry assay system such as the APO-BRDU™ Kit (Cat. No. 556405) or the APO-DIRECT™ Kit (Cat. No. 556381).

#### INDUCTION OF APOPTOSIS USING AN ANTI-MOUSE CD95 (FAS) ANTIBODY

The following protocol is provided as an illustration on how FITC Annexin V may be used on murine cells.

#### Materials

1. A cell line or primary cells that can easily be induced to undergo apoptosis by mouse Fas monoclonal antibody (mAb). Thymocytes isolated from a 4-6 week old BALB/c mouse may be used.

2. Anti-mouse CD95 (Fas) mAb, clone Jo2 (Cat. No. 554254)

3. Recombinant Protein G (Sigma-Aldrich cat.no. P4689). We have found that the addition of Protein G to the tissue culture medium can

significantly enhance the efficiency of Jo2 mAb to induce apoptosis.

4. T25 tissue culture flasks

5. RPMI-1640 medium with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine and 1% antibiotics (penicillin/ streptomycin; 100 U/ml). This supplemented medium is simply referred to as 'medium' below.

#### Procedure

1. Isolate BALB/c thymocytes from the thymus of a 4-6 week old mouse.

2. Induction of apoptosis. Add 2.5-10 µg/ml Jo2 (Cat. No. 554254) and 1-2 µg/ml Protein G to a T25 flask containing ~2 × 10e6 thymocytes/ml.

Negative controls should consist of

(a)  $\sim 2 \times 1066$  thymocytes/ml with medium alone (no mAb or Protein G)

(b) ~2 × 10e6 thymocytes/ml with medium and 1-2 μg/ml Protein G alone (no mAb).

3. Incubate the cells for 2-12 hrs at 37°C.

4. Proceed with the FITC Annexin V Staining Protocol to measure apoptosis. Apoptosis can also be observed by light microscopy, gel

electrophoresis (DNA fragmentation ladders) or by using a DNA fragmentation-based flow cytometry assay system such as the APO-BRDU<sup>TM</sup> Kit (Cat. No. 556405) or the APO-DIRECT<sup>TM</sup> Kit (Cat. No. 556381).

#### FITC ANNEXIN V STAINING PROTOCOL

FITC Annexin V is used to quantitatively determine the percentage of cells within a population that are actively undergoing apoptosis. It relies on the property of cells to lose membrane asymmetry in the early phases of apoptosis. In apoptotic cells, the membrane phospholipid phosphatidylserine (PS) is translocated from the inner leaflet of the plasma membrane to the outer leaflet, thereby exposing PS to the external environment. Annexin V is a calcium-dependent phospholipid-binding protein that has a high affinity for PS, and is useful for identifying apoptoic cells with exposed PS. Propidium Iodide (PI) is a standard flow cytometric viability probe and is useful for identifying nonviable cells. Viable cells with intact membranes exclude PI, whereas the membranes of dead and damaged cells are permeable to PI. Cells that stain positive for FITC Annexin V and negative for PI are undergoing apoptosis. Cells that stain positive for both FITC Annexin V and PI are either in the end stage of apoptosis, are undergoing necrosis, or are already dead. Cells that stain negative for both FITC Annexin V and PI are alive and not undergoing measurable apoptosis.

#### Reagents

1. FITC Annexin V: Included. Use 5 µl per test.

2. Propidium Iodide (PI): Not Included. PI (cat.no. 556463) is a convenient, ready-to-use nucleic acid dye. Use up to 10 µl per test of a 50 µg/ml solution.

 $3.10 \times$  Binding Buffer: Not Included. 0.1 M Hepes (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl2. Store at 4°C. Alternatively, catalog number 556454 may be purchased.

#### Staining

- 1. Wash cells twice with cold PBS and then resuspend cells in 1× Binding Buffer at a concentration of 1×10e6 cells/ml.
- 2. Transfer 100  $\mu$ l of the solution (1 × 10e5 cells) to a 5 ml culture tube.
- 3. Add 5 µl of FITC Annexin V.

4. Add 10  $\mu$ l PI. The optimal concentration of PI may vary among cell lines where 10  $\mu$ l of a 50  $\mu$ g/ml stock is most likely the maximum to be required. Less may yield optimal results in some experimental systems.

- 5. Gently vortex the cells and incubate for 15 min at RT (25 °C) in the dark.
- 6. Add 400 µl of 1× Binding Buffer to each tube. Analyze by flow cytometry within 1 hr.

#### SUGGESTED CONTROLS FOR SETTING UP FLOW CYTOMETRY

#### The following controls are used to set up compensation and quadrants:

- 1. Unstained cells.
- 2. Cells stained with FITC Annexin V (no PI).
- 3. Cells stained with PI (no FITC Annexin V).

#### Other Staining Controls:

A cell line that can be easily induced to undergo apoptosis should be used to obtain positive control staining with FITC Annexin V and/or FITC Annexin V and PI. It is important to note that the basal level of apoptosis and necrosis varies considerably within a population. Thus, even in the absence of induced apoptosis, most cell populations will contain a minor percentage of cells that are positive for apoptosis (FITC Annexin V positive, PI negative or FITC Annexin V positive).

The untreated population is used to define the basal level of apoptotic and dead cells. The percentage of cells that have been induced to undergo apoptosis is then determined by subtracting the percentage of apoptotic cells in the untreated population from percentage of apoptotic cells in the treated population. Since cell death is the eventual outcome of cells undergoing apoptosis, cells in the late stages of apoptosis will have a damaged membrane and stain positive for PI as well as for FITC Annexin V. Thus the assay does not distinguish between cells that have already undergone an apoptotic cell death and those that have died as a result of necrotic pathway, because in either case the dead cells will stain with both FITC Annexin V and PI.

#### Suggested Companion Products

Catalog Number	Name	Size	Clone
556454	Annexin V Binding Buffer, 10X concentrate	50 ml	(none)
556463	Propidium Iodide Staining Solution	2.0 ml	(none)

#### Product Notices

- 1. Since applications vary, each investigator should titrate the reagent to obtain optimal results.
- 2. Please refer to www.bdbiosciences.com/pharmingen/protocols for technical protocols.
- For fluorochrome spectra and suitable instrument settings, please refer to our Fluorochrome Web Page at www.bdbiosciences.com/pharmingen/colors.
- 4. Source of all serum proteins is from USDA inspected abattoirs located in the United States.
- Caution: Sodium azide yields highly toxic hydrazoic acid under acidic conditions. Dilute azide compounds in running water before discarding to avoid accumulation of potentially explosive deposits in plumbing.

#### References

Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. J Biol Chem. 1990; 265(9):4923-4928. (Biology)

Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schlissel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 33(4):1624-1629.(Methodology: Apoptosis, Flow cytometry) Homburg CH, de Haas M, von dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*. 1995; 85(2):532-540.(Biology: Apoptosis)

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994; 84(5):1415-1420.(Methodology: Apoptosis, Flow cytometry)

Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J Exp Med. 1995; 182(5):1545-1556. (Biology: Apoptosis)

Raynal P, Pollard HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. Biochim Biophys Acta. 1994; 1197(1):63-93. (Biology)

van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. Cytometry. 1996; 24(2):131-139.(Methodology: Apoptosis, Flow cytometry)

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods. 1995; 184(1):39-51 (Methodology: Apoptosis, Flow cytometry)

# **Nuclear Extract Kit**

(version D3)

Catalog Nos. 40010 & 40410

#### **Active Motif North America**

 1914 Palomar Oaks Way, Suite 150

 Carlsbad, California 92008, USA

 Toll free:
 877 222 9543

 Telephone:
 760 431 1263

 Fax:
 760 431 1351

#### **Active Motif Europe**

Avenue Reine Astrid, 92	
B-1310 La Hulpe, Belgium	
UK Free Phone:	0800 169 31 47
France Free Phone:	0800 90 99 79
Germany Free Phone:	0800 181 99 10
Telephone:	+32 (0)2 653 0001
Fax:	+32 (0)2 653 0050

#### Active Motif Japan

Azuma Bldg, 7th Floor 2-21 Ageba-Cho, Shinjuku-Ku Tokyo, 162-0824, Japan Telephone: +81 3 5225 3638 Fax: +81 3 5261 8733

#### Active Motif China

787 Kangqiao Road Building 10, Suite 202, Pudong District Shanghai, 201315, China Telephone: (86)-21-20926090 Hotline: 400-018-8123

Copyright 2014 Active Motif, Inc.

## Introduction

The Nuclear Extract Kit has been developed for the preparation of nuclear, whole-cell and cytoplasmic extracts from cells or tissue. The kit procedure is a simple, fast and effective way to obtain non-denatured, active proteins contained in cytoplasmic and nuclear compartments of the cell. The proteins collected by this high-salt extraction method can be used for a variety of standard protocols including electrophoretic mobility shift assay (EMSA), DNA footprinting, Western blotting and preparative purification of nuclear proteins for use in downstream applications such as enzyme activity assays or binding studies. The Nuclear Extract Kit is the recommended method for preparation of cell extracts for use in Active Motif's TransAM<sup>™</sup> assays to monitor transcription factor activation.

Each kit provides reagents for 100 or 400 extractions from 8.8 x 10<sup>6</sup> cells, which corresponds to HeLa cells grown to confluence in a 100 mm tissue culture dish.

The Nuclear Extract Kit is intended for use for preparation of nuclear, cytoplasmic and whole-cell fractions from various cell and tissue types. Extractions can be performed with fresh and frozen cell and tissue samples.

For preparation of nuclear extracts, the cells are first collected in ice-cold PBS in the presence of Phosphatase Inhibitors to limit further protein modifications (expression, proteolysis, dephosphorylation, etc.). Then, the cells are resuspended in Hypotonic Buffer to swell the cell membrane and make it fragile. Addition of the Detergent causes leakage of the cytoplasmic proteins into the supernatant. After collection of the cytoplasmic fraction, the nuclei are lysed and the nuclear proteins are solubilized in detergent-free Lysis Buffer in the presence of the Protease Inhibitor Cocktail.

To prepare whole-cell extracts, cells are collected in the PBS/Phosphatase Inhibitors solution and lysed in the Lysis Buffer. Solubilized proteins are separated from the cell debris by centrifugation.

To prepare extracts from fresh or frozen tissue, samples are diced and disrupted using a Dounce homogenizer to form a single-cell slurry. Cells are then lysed in the lysis buffer and solubilized proteins are separated from the cell debris by centrifugation.

The protein concentration of the cell extract is then measured by Active Motif's ProStain™ Protein Quantification Kit (Catalog No. 15001) or a Bradford-based assay.

For your convenience, Active Motif offers over 100 different nuclear, whole-cell and cytoplasmic extracts from a variety of cells and tissues (see Appendix, Section C).

## Kit Performance and Benefits

## The Nuclear Extract Kit is for research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Assay time:	2 hours
Yield of protein:	Cytoplasmic extract: ~0.5-1 mg at ~1-2 mg/ml from 8.8 x 10° cells Nuclear extract: ~0.15-0.25 mg at ~3-5 mg/ml from 8.8 x 10° cells Whole-cell extract: ~1.2-2.4 mg at 4-8 mg/ml from 8.8 x 10° cells
	(Note: Example is from HeLa cells grown to confluency)
Assay compatibility:	TransAM <sup>™</sup> , EMSA, DNA footprinting, Western blotting, preparative nuclear protein purification, protein assays. Active transcription factors extracted include NFκB, AP-1, CREB, p53, HIF-1, STAT, Sp1, NFAT, MyoD, NF-YA, C/EBP and PPAR <sub>Y</sub> . Successful extraction has been performed with HeLa, WI-38, COS-7, PC-12, Jurkat and RINm5F cells, and many more. Extraction can be per- formed with fresh or frozen cell and tissue samples.
Time Course Studies:	For time course studies where the effectors are added at different timepoints, we suggest that cells be lysed and processed at the same time to maintain consistency among samples.

## Kit Components and Storage

Kit components can be stored at  $-20^{\circ}$ C prior to first use. Then, we recommend storing each component at the temperatures recommended in the table below:

Reagents	Quantity 100 rxns / 400 rxns	Storage/Stability
Lysis Buffer AM1	10 ml / 50 ml	4°C for 6 months
1 M Dithiothreitol (DTT)	100 µl / 500 µl	-20°C for 1 year
Protease Inhibitor Cocktail	100 µl / 500 µl	-20°C for 1 year
10X PBS	100 ml / 4 x 100 ml	4°C for 6 months
Phosphatase Inhibitors	50 ml / 4 x 50 ml	4°C for 6 months
10X Hypotonic Buffer	50 ml / 4 x 50 ml	4°C for 6 months
Detergent	3 ml / 4 x 3 ml	4°C for 1 year

## Additional Materials Required

5 and 10 ml pipettes Pipettors Cell scraper 15 ml conical tubes Microcentrifuge tubes Centrifuge (with swinging buckets adapted to 15 ml conical tubes) and microcentrifuge pre-cooled at 4°C Rocking platform Distilled water

## **Optional Additional Materials**

Dounce homogenizer, 2 ml capacity, with a large (looser, A) pestle clearance of 0.12 mm for the initial sample reduction, and a small (tighter, B) pestle clearance of 0.06 mm for the final homogenate

Note: Adherent and suspension cell preparations require the small-clearance (B) pestle whereas fresh and frozen tissue preparations require both large (A)- and small (B)-clearance pestles.

(Suggested Dounce homogenizer: Active Motif, Catalog Nos. 40401 and 40415)

## Protocols – Buffer Preparation and Recommendations

## Reagents from the Nuclear Extract Kit

#### Preparation of PBS/Phosphatase Inhibitors

The PBS/Phosphatase Inhibitors solution should be a clear yellow color. It may precipitate during storage and become turbid in appearance. If this occurs, heat at 50°C for 10 minutes and resuspend completely before proceeding. Consult the appropriate protocol (nuclear, cytoplasmic or whole-cell extract from cells or from tissue) to determine the amount of PBS/Phosphatase Inhibitors solution that will be required for your extraction(s). For example, to make nuclear extract from a 100 mm plate of cells, prepare 8 ml of PBS/Phosphatase Inhibitors solution as follows: mix 0.8 ml 10X PBS in 6.8 ml distilled water, then add 0.4 ml Phosphatase Inhibitors. Since the Phosphatase Inhibitors lose their activity 24 hours after dilution, the solution should be used within this time frame. Any remaining solution should be discarded if not used on the same day.

#### Preparation of 1X Hypotonic Buffer

Note that the Hypotonic Buffer already contains phosphatase (but not protease) inhibitors. Consult the protocol you intend to use (nuclear, cytoplasmic or whole-cell extract from cells or from tissue) to determine the amount of 1X Hypotonic Buffer that will be required for your extraction(s). For example, to make nuclear extract from a 100 mm plate of cells, prepare 500  $\mu$ l of 1X Hypotonic Buffer as follows: mix 50  $\mu$ l 10X Hypotonic Buffer and 450  $\mu$ l distilled water. Any remaining 1X Hypotonic Buffer can be stored at 4°C for 1 week.

#### Preparation of 10 mM DTT

The Nuclear Extract Kit is supplied with 1 M DTT. To make Complete Lysis Buffer, you will need to first dilute the 1 M DTT to create 10 mM DTT. However, 1 M DTT is used to perform nuclear and cytoplasmic extractions from tissue (see Protocol II: Fresh or Frozen Tissue on page 10). To make 10 mM DTT, make a 1:100 dilution of the supplied 1 M DTT in distilled water. For example, add 1  $\mu$ l of 1 M DTT to 99  $\mu$ l distilled water. DTT is highly labile, so 10 mM DTT must be prepared fresh each time. Avoid multiple freeze/thaw cycles.

## Preparation of Complete Lysis Buffer

Note that the Complete Lysis Buffer already contains phosphatase (but not protease) inhibitors. The presence of phosphatase inhibitors gives a yellow coloration to Lysis Buffer AM1. Consult the appropriate protocol (nuclear, cytoplasmic or whole-cell extract from cells or from tissue) to determine the amount of Complete Lysis Buffer that will be required for your extraction(s). For example, to make nuclear extract from a 100 mm plate of cells, prepare 50  $\mu$ l Complete Lysis Buffer as follows: add 5  $\mu$ l 10 mM DTT to 44.5  $\mu$ l of Lysis Buffer AM1, then add 0.5  $\mu$ l Protease Inhibitor Cocktail. Since some of the protease inhibitors lose their activity promptly after dilution. Therefore, use the Complete Lysis Buffer immediately for cell lysis. Any remaining amount should be discarded if not used on the same day.

## A. Preparation of Nuclear Extract from Cells

The following protocol is based on samples of approximately 8.8 x 10<sup>6</sup> cells, which correspond to HeLa cells grown to confluence in a 100 mm tissue culture plate. Each sample is one reaction. Prepare PBS/Phosphatase Inhibitors, Hypotonic Buffer and Complete Lysis Buffer as described above on page 5 in the section Buffer Preparation. Adjust the volumes according to the buffer preparation chart if using plates of different sizes. Place buffers and any tubes needed on ice before beginning assay.

Reagents to Prepare	Components	60 mm plate or 3.2 x 10° cells	100 mm plate or 8.8 x 10° cells	150 mm plate or 2 x 10 <sup>7</sup> cells
PBS/Phosphatase Inhibitors	10X PBS	0.4 ml	0.8 ml	1.6 ml
	Distilled water	3.4 ml	6.8 ml	13.6 ml
	Phosphatase Inhibitors	0.2 ml	0.4 ml	0.8 ml
	TOTAL REQUIRED	4.0 ml	8.0 ml	16.0 ml
1X Hypotonic Buffer	10X Hypotonic Buffer	25.0 µl	50.0 µl	100.0 µl
	Distilled water	225.0 µl	450.0 μl	0.9 ml
	TOTAL REQUIRED	250.0 μl	500.0 μl	1.0 ml
Complete Lysis Buffer	10 mM DTT	2.5 µl	5 µl	10.0 µl
	Lysis Buffer AM1	22.25 µl	44.5 µl	89.0 µl
	Protease Inhibitor Cockta	il 0.25 μl	0.5 µl	1.0 µl
	TOTAL REQUIRED	25.0 µl	50.0 μl	100.0 µl
*(Optional) Detergent	TOTAL REQUIRED	1.25 µl	2.5 µl	5 µl

## Quick Chart for Preparing Buffers for Nuclear Extraction from Cells

\*The addition of Detergent to the nuclear pellet may help with solubility of proteins, specifically those tightly associated with membranes or chromatin.

## Step 1: Cell Collection

- 1. Aspirate media out of dish. Wash with 5 ml ice-cold PBS/Phosphatase Inhibitors. Aspirate solution out and add 3 ml ice-cold PBS/Phosphatase Inhibitors. If working with suspension cells, pellet cells and wash with 3 ml ice-cold PBS/Phosphatase Inhibitors and proceed to step 3.
- 2. Remove cells from dish by gently scraping adherent cells with cell lifter or, alternatively, pellet suspension cells by centrifugation. Transfer cells to a pre-chilled 15 ml conical tube.

**Note:** Use of trypsin to detach cells can activate some signal transduction pathways.

- 3. Centrifuge cell suspension for 5 minutes at 200 x g in a centrifuge pre-cooled at 4°C.
- 4. Discard supernatant. Keep cell pellet on ice.



#### Step 2: Cytoplasmic Fraction Collection

- Note: Make sure to verify cell lysis efficiency and release of the nuclei by comparing the appearance of cells before and after cell lysis (steps 1 and 2) using phase-contrast microscopy. Intact cells should appear as a dark central nucleus surrounded by a halo of less dense cytoplasm.
- Gently resuspend cells in 500 µl 1X Hypotonic Buffer by pipetting up and down several times. Transfer to a pre-chilled microcentrifuge tube. Allow cells to swell by incubating for 15 minutes on ice.
- 2. Add 25 µl Detergent (for tissue, add 5 µl Detergent per every 100 µl Hypotonic Buffer) and vortex 10 seconds at the highest setting.
- 3. Check a small sample under the microscope to verify that cells have been efficiently lysed and that nuclei have been released. If the cells are not adequately lysed at this step, use an ice-cold Dounce homogenizer with a small-clearance (B) pestle to lyse the cells (refer to the Troubleshooting Guide in Section A of the Appendix, page 14, for further information).

Note: Do not proceed with the centrifugation step until the cells are sufficiently lysed.

- 4. Centrifuge suspension for 30 seconds at 14,000 x g in a microcentrifuge pre-cooled at 4°C.
- 5. Transfer supernatant (cytoplasmic fraction) into a pre-chilled microcentrifuge tube. Store the supernatant at -80°C until ready to use. Use the pellet for nuclear fraction collection. <u>OPTIONAL</u>: Save a fraction of the supernatant (cytoplasmic fraction) for determination of fractionation efficiency by Western blot.

## Step 3: Nuclear Fraction Collection

- Resuspend nuclear pellet in 50 µl Complete Lysis Buffer by pipetting up and down. <u>OPTIONAL:</u> Add 2.5 µl Detergent to help solubilize membrane-associated nuclear proteins. A very viscous pellet may form and not completely resuspend. Alternatively, a Dounce homogenizer can be used (refer to the Troubleshooting Guide in Section A of the Appendix, page 14, for further information). Vortex 10 seconds at the highest setting.
- 2. Incubate suspension for 30 minutes on ice on a rocking platform set at 150 rpm.
- 3. Vortex 30 seconds at the highest setting. Centrifuge for 10 minutes at 14,000 x g in a microcentrifuge pre-cooled at 4°C. Transfer supernatant (nuclear fraction) into a pre-chilled microcentrifuge tube. <u>OPTIONAL</u>: Save a fraction of the supernatant (nuclear fraction) for determination of fractionation efficiency by Western blot.
- 4. Aliquot and store at -80°C. Avoid freeze/thaw cycles.
  - Note: The presence of certain detergents or PMSF may interfere with the Bradford assay, thus perform a 1:50 or 1:250 dilution of your samples. Use the Complete Lysis Buffer as the blank with a similar dilution as the samples. Read the absorbance at 595 nm with a plate reader spectrophotometer (refer to the Appendix, Section A on page 13 for an example dilution series page 13). As an alternative, try Active Motif's ProStain<sup>™</sup> Protein Quantification Kit (Catalog No 15001), which offers greater sensitivity and resistance to many contaminating agents.

# Appendix

# Section B. Troubleshooting Guide

Problem/question	Possible cause	Recommendation
Low protein concentration in cytoplasmic fraction	Volumes of extraction reagents not appropri- ate for given number of cells	Adjust volumes of reagents as indicated in the Quick Chart for Preparing Buffers.
	Plasma cell membrane not disrupted in cell pellet in Step 2, No. 1 of the Preparation of Nuclear Extract from Cells of Protocol I (page 7)	Gently pipette up and down to disrupt cell pellet. Monitor lysis under microscope. Use Dounce homogenizer with small- clearance (B) pestle.
Low protein concentration in nuclear fraction	Incorrect volume of Lysis Buffer or starting cell number	Decrease volume of Lysis Buffer or increase number of cells.
	Volumes of extraction reagents not appropri- ate for given number of cells	Adjust volumes of reagents as indicated in the Quick Chart for Preparing Buffers.
	Nuclear proteins lost in cytoplasmic fraction after rupture of nuclei	Monitor under microscope. Reduce vortex, centrifuge force and time in Step 2, Nos. 2 and 3 of the Preparation of Nuclear Extract from Cells section of Protocol I (page 7). Stop incuba- tion when nuclei are released.
	Nuclear pellet not dispersed in Step 3, No. 1 of the Preparation of Nuclear Extract from Cells of Protocol I (page 7)	Vortex thoroughly to ensure nuclear lysis. Use the Dounce homogenizer if the pellet has trouble solubilizing.
No or low protein yield in either cytoplasmic or nuclear fractions	Cell type is not compatible with extraction procedure	Swelling and lysis conditions and reagents need to be optimized for this cell type.
	Overlysis	Nuclear proteins are present in cytoplasmic fraction. Reduce incubation time in Hypotonic Buffer. For frozen samples, cytoplasmic fraction will have proteins due to nuclear lysis during freeze/thaw.
	Incomplete lysis	Cytoplasmic proteins are present in the nuclear fraction. Check cells under a microscope after adding Detergent for presence of free nuclei indicative of efficient lysis. Alternatively, perform 10 strokes with a chilled Dounce homogenizer with a small- clearance (B) pestle to completely lyse cells.
Poor protein compartmentalization	Incomplete removal of cytoplasmic fraction	Make sure to remove all cytoplasmic fraction from the nuclear pellet before adding Lysis Buffer.
No or low protein activity	Collected proteins are degraded	Maintain low temperature requirements during procedure. Limit procedure time to a minimum and snap freeze aliquots right away. Add more or different protease inhibitors.
Nuclear pellet is viscous and will not resuspend	Incomplete dispersal of nuclear pellet	Vortex thoroughly to ensure nuclear lysis. Use the Dounce homogenizer if the pellet has trouble solubilizing. Certain cell types produce a viscous nuclear pellet and still produce effi- cient yield from the nuclear extraction.

# **TransAM<sup>™</sup> STAT Family** Transcription Factor Assay Kit

(version E2)

Catalog No. 42296

#### **Active Motif North America**

 1914 Palomar Oaks Way, Suite 150

 Carlsbad, California 92008, USA

 Toll free:
 877 222 9543

 Telephone:
 760 431 1263

 Fax:
 760 431 1351

#### Active Motif Europe

 Avenue Reine Astrid, 92

 B-1310 La Hulpe, Belgium

 UK Free Phone:
 0800 169 31 47

 France Free Phone:
 0800 90 99 79

 Germany Free Phone:
 0800 181 99 10

 Telephone:
 +32 (0)2 653 0001

 Fax:
 +32 (0)2 653 0050

#### Active Motif Japan

Azuma Bldg, 7th Floor 2-21 Ageba-Cho, Shinjuku-Ku Tokyo, 162-0824, Japan Telephone: +81 3 5225 3638 Fax: +81 3 5261 8733

Copyright 2013 Active Motif, Inc.

## Overview

Signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins are latent transcription factors that are activated by phosphorylation via tyrosine kinases. Over 35 different extracellular polypeptides activate Janus kinase associated receptors, leading to phosphorylation of Janus kinases and the subsequent phosphorylation of STAT proteins. Upon phosphorylation, the STAT proteins dimerize and migrate to the nucleus where they exert transcriptional activation. Phosphorylation of a single tyrosine localized around residue 700 is crucial for activation of each STAT family member'. STAT proteins are involved in a wide variety of biological pathways. STATI is involved in the activation of IFN $\alpha$  and IFN $\gamma$  genes, STAT2 in the activation of IFN $\alpha$  genes, STAT4 in T-helper cell development and STAT5 in milk production. Disruption of STAT functions in mouse leads to several defects such as immune deficiency (STAT1), embryonic lethality (STAT2), lack of gastrulation (STAT3), T-helper 1 cell dysfunction of STAT signaling blocks neoplastic transformation, thus making inhibitors of STAT proteins candidates for the treatment of cancer. Therefore, accurate monitoring of STAT activity in cells, tissues or animals is crucial for biomedical research and drug development.

With its patented TransAM<sup>™</sup> method<sup>\*</sup>, Active Motif introduced the first ELISA-based kits to detect and quantify transcription factor activation. TransAM Kits combine a fast, user-friendly format with a sensitive, specific assay. TransAM STAT Family Kits are designed specifically for the study of STAT pathways. They contain a 96-well plate to which oligonucleotide containing a STAT consensus binding site has been immobilized. STATs contained in nuclear extracts binds specifically to this oligonucleotide and are detected through use of an antibody directed against STAT 1α, 3, 5A or 5B. Addition of a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) provides sensitive colorimetric readout that is easily quantified by spectrophotometry. The 96-well plate with individual strips of 8 wells is suitable for manual use or high-throughput screening applications:

product	format	catalog no.
TransAM <sup>™</sup> STAT Family	2 x 96 rxns	42296

1

\* Technology covered by AAT-filed patents and licensed to Active Motif.



## Introduction

#### STAT Transcription Factor

STAT (signal transducers and activators of transcription) transcription factors were discovered fourteen years ago as mediators of interferon-induced gene expression. They comprise a family of latent cytoplasmic proteins that are activated to participate in gene control when cells encounter various extracellular polypeptides. Their critical role in development and normal cell signaling has been largely determined through the analysis of transgenic mice lacking individual STAT genes. The STAT family consists of seven members that are activated by virtually every cytokine and growth factor (Table 1).

Factor	Mass (kDa)	Activating Cytokine	Reference No.
STAT1	91	IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , EGF, PDGF, FGF, ACRII,	1
STAT2	113	IFN $lpha/eta$ (with STAT1)	1
STAT3	92	IL-6, LIF, CNTF, OM, CT-1, EGF, G-CSF, IL-10, leptin	1, 2, 3
STAT4	89	IL-12	2, 4
STAT 5A, 5B	77, 80	IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-15, GM-CSF, Prolactin, Epo	5, 6
STAT6	94	IL-4, IL-13	7, 8

The STAT proteins are unique among transcription factors in containing an SH2 (src-homology 2), phosphotyrosine-binding domain, a common protein-protein interaction domain among signaling proteins<sup>9</sup>. Tyrosine phosphorylation around residue 700 is essential for the dimerization of STATs and the concomitant nuclear translocation of the dimer. Ligand-activated receptors that catalyze this phosphorylation include receptors with intrinsic tyrosine kinase activity (epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and colony-stimulating factor-1) as well as receptors that lack intrinsic tyrosine kinase activity but to which Janus kinases (JAKs) are noncovalently associated<sup>10, 11</sup>. Receptors to which JAKs are bound are often referred to as cytokine receptors. Their ligands include IFN- $\alpha$ ,  $-\beta$  and  $-\gamma$ ; interleukins (IL) 2 to 7, 10 to 13, and 15; and erythropoietin, growth hormone, prolactin, thrombopoietin and other polypeptides. STAT dimers and heterodimers, but not monomers, are competent to bind DNA. The known DNA binding heterodimers are STATI:2 (strong binding requires the joint presence of another protein, p48) and STATI:3<sup>12</sup>. STATs that form homodimers that bind DNA include STAT 1, 3, 4, 5 (STAT5A and 5B interact in a manner equivalent to a heterodimer) and 6<sup>10, 11, 12</sup>.

In most cases, STAT activation is transient. Inactivation of STAT proteins is carried out by several mechanisms, including dephosphorylation of STAT proteins in the nucleus and degradation through the ubiquitin-proteosome pathway<sup>8</sup>. A novel family of negative feedback inhibitors of the JAK-STAT pathway has been identified, referred to as suppressor-of-cytokine-signaling (SOCS) proteins/JAK binding (JAB) proteins, and STAT-induced STAT inhibitors (SSIs)<sup>34,15,46</sup>. In addition, a family of protein inhibitors of activated STAT (PIAS) proteins has been identified<sup>77,18</sup>.

#### **Transcription Factor Assays**

To date, three methods are widely used to measure STAT activation, either directly or indirectly:

- 1. STAT expression can be measured by Western blot, using antibodies raised against STAT subunits. This method is time consuming (up to 2 days once the cell extracts are prepared), and is not suitable for processing large numbers of samples.
- 2. The DNA-binding capacity of STAT can be assayed by gel retardation, also called electrophoretic mobility shift assay (EMSA). In this method, nuclear extracts are incubated with a radioactive double-stranded oligonucleotide probe containing the consensus sequence for STAT binding. If STAT is active in the nuclear extract, it will bind to the probe. Samples are then resolved by electrophoresis on a native polyacrylamide gel, followed by autoradiography. This method is sensitive, but like the previous procedure, it is time consuming (multiple days of gel exposure may be required to achieve sufficient sensitivity) and it cannot be applied to high-throughput screening. Gelshift assays also require special precautions and equipment for handling radioactivity.
- 3. Another method used to assay STAT activation is based on reporter genes, typically luciferase or  $\beta$ -galactosidase, placed under the control of a promoter containing the STAT consensus sequence. This promoter can be artificial, made of several STAT cis-elements and a TATA box, or natural, like the HIV long terminal repeat (LTR) sequence. Limitations of this procedure are: (i) reporter gene assays have to be repeated several times to obtain statistically reliable data; and (ii) reporter gene assays are sensitive to confounding factors that may influence the expression level of the reporter gene. Therefore, assays have to be carefully standardized. This method is sensitive and easy to perform with a large number of samples but requires efficient cell transfection with the reporter plasmid.

#### **TransAM STAT Family**

STAT transcription factors convert extracellular stimuli into diverse biological responses such as the regulation of development, cell proliferation, differentiation and apoptosis. Aberrant STAT signaling can affect the outcome of these pathways and result in oncogenesis. Discovery and development of novel inhibitors of STAT signaling hold significant promise for providing more effective treatment for a wide variety of cancers at various stages of malignant progression.

To help achieve this, Active Motif offers a high-throughput assay to quantify STAT 1 $\alpha$ , 3, 5A and 5B activation<sup>7</sup>. The TransAM Kit combines a fast and user-friendly ELISA format with a sensitive and specific assay for transcription factors. TransAM STAT Family Kits contain a 96-well plate on which has been immobilized oligonucleotide containing the STAT consensus binding site (5 - TTCCCG-GAA-3 -). The active form of STAT contained in nuclear extract specifically binds to this oligonucleotide. The primary antibodies used to detect STAT recognize an epitope on STAT 1 $\alpha$ , 3, 5A or 5B that is accessible only when STAT is activated and bound to its target DNA. The anti-STAT1 $\alpha$  antibody recognizes only the alpha subunit of human STAT1, the anti-STAT3 antibody recognizes both the alpha and beta forms of human STAT5A and STAT5B. An HRP-conjugated secondary

antibody provides a sensitive colorimetric readout that is easily quantified by spectrophotometry. Once the nuclear extract is prepared, this assay is completed in less than 3.5 hours. As this assay is performed in a 96-well plate, a large number of samples can be handled simultaneously, allowing for high-throughput automation. This assay is specific for STAT activation and has been shown to be 10-fold more sensitive and 40-fold faster than the gel retardation technique. With the 3.5-hour procedure of TransAM, we could detect STAT activation with as little as 0.6 µg of nuclear extract. A comparable assay using EMSA required 5 µg of nuclear extract and a 5-day autoradiography.

TransAM has many applications including the study of drug potency, inhibitor or activator proteins, and/or protein structure/function in the STAT signaling pathway.

## **Kit Performance and Benefits**

**Detection limit:** < 0.6 µg nuclear extract/well. The TransAM STAT Family Kit is up to 10-fold more sensitive than EMSA.

**Range of detection:** TransAM provides quantitative results from 0.3 to 10 µg of nuclear extract per well.

**Cross-reactivity:** TransAM STAT Family detects STAT  $1\alpha$ , 3, 5A and 5B from human and rat origin. STAT3 can also be detected in mouse. Reactivity with other species has not been determined.



Assay time: 3.5 hours.

Monitoring STAT Family member activation using the TransAM STAT Family Kit. STAT  $1\alpha$ , 3, 5A and 5B activation were assayed using the TransAM STAT Family Kit. 1:000 dilutions of STATI and STAT5 antibodies and a 1:1000 dilution of STAT3 antibody were tested using 5 µg/well of nuclear extract prepared from a stimulated cell line: STAT1 $\alpha$  was tested with COS-7 (IFN $\gamma$ ), STAT3 with Hep G2 (IL-6, 100 ng/ml), and STAT5A and STAT5B with Nb2 (prolactin). Assays were performed in the absence or presence of 20 pmol of competitor oligonucleotide that contains either a wild-type or mutated STAT consensus binding site. Note that the wild-type oligonucleotide reduces STAT binding by over 90%, while incubation with the mutant STAT competitor oligo has a limited effect on STAT binding to DNA. This data is provided for demonstration purposes only.

## Kit Components and Storage

Except for the nuclear extract that must be kept at -80°C, kit components can be stored at -20°C prior to first use. Then, we recommend storing each component at the temperature indicated in the table below.

Reagents	Quantity	Storage / Stability
STATI $lpha$ antibody	11 µl	-20°C for 6 months
STAT3 antibody	20 µl	-20°C for 6 months
STAT5A antibody	11 µl	-20°C for 6 months
STAT5B antibody	11 µl	-20°C for 6 months
Anti-rabbit HRP-conjugated IgG	2 x 11 μl (0.2 μg/μl)	4°C for 6 months
Wild-type oligonucleotide AM6	100 µl (10 pmol/µl)	-20°C for 6 months
Mutated oligonucleotide AM6	100 µl (10 pmol/µl)	-20°C for 6 months
Nb2 nuclear extract (prolactin stimulated)	40 µl (2.5 µg/µl)	-80°C for 6 month
Dithiothreitol (DTT)	100 µl (1 M)	-20°C for 6 months
Herring Sperm DNA	100 µl (1 µg/µl)	-20°C for 6 months
Protease Inhibitor Cocktail	100 µl	-20°C for 6 months
Lysis Buffer AM1	10 ml	4°C for 6 months
Binding Buffer AM6	10 ml	4°C for 6 months
10X Wash Buffer AM2	60 ml	4°C for 6 months
10X Antibody Binding Buffer AM2	2 x 2.2 ml	4°C for 6 months
Developing Solution	2 x 11 ml	4°C for 6 months
Stop Solution	60 ml	4°C for 6 months
96-well STAT assay plate	2	4°C for 6 months
Plate sealer	2	

#### Additional materials required

- Multi-channel pipettor
- Multi-channel pipettor reservoirs
- Rocking platform
- Microplate spectrophotometer capable of reading at 450 nm (655 nm as optional reference wavelength)

## Protocols

## **Buffer Preparation and Recommendations**

#### Preparation of Complete Lysis Buffer

We provide an excess of Lysis Buffer AM1 in order to perform the assay AND to prepare customized cell extracts. Our Nuclear Extract Kit can also be purchased separately (Cat. Nos. 40010 & 40410). Prepare the amount of Complete Lysis Buffer required for the assay by adding 1 µl of 1 M DTT and 10 µl of Protease Inhibitor Cocktail per ml of Lysis Buffer AM1 (see the Quick Chart for Preparing Buffers in this section). Some of the protease inhibitors lose their activity after 24 hours once diluted. Therefore, we recommend using the Complete Lysis Buffer immediately for cell lysis. The remaining amount should be discarded if not used in the same day.

#### Preparation of Complete Binding Buffer

Prepare the amount of Complete Binding Buffer required for the assay by adding 2  $\mu$ l of 1 M DTT and 10  $\mu$ l of Herring Sperm DNA per ml of Binding Buffer AM6 (see the Quick Chart for Preparing Buffers in this section). After use, discard remaining Complete Binding Buffer.

#### Preparation of 1X Wash Buffer

Prepare the amount of 1X Wash Buffer required for the assay as follows: For every 100 ml of 1X Washing Buffer required, dilute 10 ml 10X Wash Buffer AM2 with 90 ml distilled water (see the Quick Chart for Preparing Buffers in this section). Mix gently to avoid foaming. The 1X Wash Buffer may be stored at 4°C for one week. The Tween 20 contained in the 10X Wash Buffer AM2 may form clumps, therefore homogenize the buffer by vortexing for 2 minutes prior to use.

#### Preparation of 1X Antibody Binding Buffer

Prepare the amount of 1X Antibody Binding Buffer required for the assay as follows: For every 10 ml of 1X Antibody Binding Buffer required, dilute 1 ml 10X Antibody Binding Buffer AM2 with 9 ml distilled water (see the Quick Chart for Preparing Buffers in this section)\*. Mix gently to avoid foaming. Discard remaining 1X Antibody Binding Buffer after use. The BSA contained in the 10X Antibody Binding Buffer AM2 may form clumps, therefore homogenize the buffer by warming to room temperature and vortexing for 1 minute prior to use. Dilute the STAT3 antibody to 1:1000 and STAT1, STAT5A and STAT5B antibodies and secondary HRP antibody to 1:1000 with the 1X Antibody Binding Buffer. Depending on the particular assay, the signal:noise ratio may be optimized by using higher dilutions of both antibodies. This may decrease the sensitivity of the assay.

\* Volumes listed refer to the preparation of buffer for diluting both the primary & secondary antibodies.

#### **Developing Solution**

The Developing Solution should be warmed to room temperature before use. The Developing Solution is light sensitive, therefore, we recommend avoiding direct exposure to intense light during storage. The Developing Solution may develop a yellow hue over time. This does not affect product performance. A blue color present in the Developing Solution indicates that it has been contaminated and must be discarded. Prior to use, place the Developing Solution at room temperature for at least 1 hour. Transfer the amount of Developing Solution required for the assay into a secondary container before aliquoting into the wells (see the Quick Chart for Preparing Buffers in this section). After use, discard remaining Developing Solution.

#### **Stop Solution**

Prior to use, transfer the amount of Stop Solution required for the assay into a secondary container (see the Quick Chart for Preparing Buffers in this section). After use, discard remaining Stop Solution.

**WARNING:** The Stop Solution is corrosive. Wear personal protective equipment when handling, *i.e.* safety glasses, gloves and labcoat.

#### Nb2 (prolactin stimulated) Nuclear Extract

Nb2 (prolactin stimulated) nuclear extract is provided as a positive control to ensure that the kit reagents are functional. The Nb2 (prolactin stimulated) extract gives a strong signal for both STAT5A and STAT5B. This extract is optimized to give a strong signal when used at 5 µg/well. Sufficient extract is supplied for 20 reactions each. We recommend aliquoting the extract in 5 µl fractions and storing at -80°C to help avoid multiple freeze/thaw cycles of the extract.

In addition, positive control nuclear extract for STATIα and STAT3 can be purchased separately. COS-7 (IFNγ stimulated) nuclear extract is recommended for STAT1 and Hep G2 (IL-6 stimulated, 100 ng/ml) nuclear extract is recommended for STAT3 (see Appendix, Section B. Related Products).

#### Wild-type and mutated consensus oligonucleotides

The wild-type consensus oligonucleotide is provided as a competitor for STAT binding in order to monitor the specificity of the assay. Used at 20 pmol/well, the oligonucleotide will prevent STAT binding to the probe immobilized on the plate. Conversely, the mutated consensus oligonucleotide should have no effect on STAT binding. Prepare the required amount of wild-type and/or mutated consensus oligonucleotide by adding 2 µl of appropriate oligonucleotide to 31.8 µl of Complete Binding Buffer per well being used (see the Quick Chart for Preparing Buffers in this section). To allow for optimum competition, add the oligonucleotide to the well prior to addition of the cell extract.

Reagents to prepare	Components	1 well	1 strip (8 wells) (4	6 strips 48 wells)	12 strips (96 wells)
Complete Lysis Buffer	DTT	0.02 μl	0.2 μl	1.2 μl	2.4 μl
	Protease Inhibitor Cocktail	0.23 μl	1.8 μl	10.8 μl	21.6 μl
	Lysis Buffer	22.25 μl	178.0 μl	1.068 r	nl 2.136 ml
	<b>Total Required</b>	<b>22.5 μl</b>	<b>180.0 μl</b>	<b>1.08 m</b>	<b>l 2.16 ml</b>
Complete Binding Buffer	DTT	0.07 µl	0.54 μl	3.2 µl	6.5 μl
	Herring Sperm DNA	0.34 µl	2.7 μl	16.2 µl	32.4 μ
	Binding Buffer	33.39 µl	266.8 μl	1.6 ml	3.2 ml
	<b>Total Required</b>	<b>33.8 µl</b>	<b>270 μl</b>	<b>1.62 m</b>	3 <b>.24 ml</b>
Binding Buffer with	wt or mut oligont	4 μl	32 μl	192 µl	N/A
STAT wt or	Complete Binding Buffer	41 μl	328 μl	1.97 ml	N/A
mut oligont	<b>Total Required</b>	<b>45.0 μl</b>	<b>360.0 μl</b>	<b>2.16 ml</b>	<b>N/A</b>
1X Washing Buffer	Distilled Water	2.025 r	nl 16.2 ml	97.2 ml	194.4 ml
	10X Washing Buffer	225.0 μl	1.8 ml	10.8 ml	21.6 ml
	<b>Total Required</b>	<b>2.25 m</b>	I <b>l 18.0 ml</b>	<b>108.0 ml</b>	<b>216.0 ml</b>
1X Antibody Binding Buffer*	Distilled Water 10X Antibody Binding Buffer <b>Total Required</b>	202.5 μl 22.5 μl <b>225.0 μl</b>	1.62 ml 180.0 μl <b>1.8 ml</b>	9.72 ml 1.08 m <b>10.8 ml</b>	19.44 ml 2.16 ml <b>21.6 ml</b>
Developing Solution	Total Required	112.5 µl	900.0 µl	5.4 ml	10.8 ml
Stop Solution	Total Required	112.5 µl	900.0 µl	5.4 ml	10.8 ml

## **Quick Chart for Preparing Buffers**

\* Volumes listed refer to the preparation of buffer for diluting both the primary & secondary antibodies.

## **STAT Transcription Factor Assay**

Determine the appropriate number of microwell strips required for testing samples, controls and blanks in duplicate. If less than 8 wells in a strip need to be used, cover the unused wells with a portion of the plate sealer while you perform the assay. The content of these wells is stable at room temperature if kept dry and, therefore, can be used later for a separate assay. Store the unused strips in the aluminum pouch at 4°C. Use the strip holder for the assay.

Prepare the Complete Lysis Buffer, Complete Binding Buffer, 1X Wash Buffer and 1X Antibody Binding Buffer as described above in the section Buffer Preparation and Recommendations. Multichannel pipettor reservoirs may be used for dispensing the Complete Binding Buffer, Wash Buffer, Antibody Binding Buffer, Developing Solution and Stop Solution into the wells being used.

## Step 1: Binding of STAT to its Consensus Sequence

- Add 30 μl Complete Binding Buffer to each well to be used. If you wish to perform competitive binding experiments, add 30 μl Complete Binding Buffer that contains 20 pmol (2 μl) of the wild-type or mutated oligonucleotide (see the Buffer Preparation section above for a description of competitive binding).
- 2. **Sample wells:** Add 20 μl of sample diluted in Complete Lysis Buffer per well. We recommend using 2-20 μg of nuclear extract diluted in Complete Lysis Buffer per well. A protocol for preparing nuclear extracts can be found on page 11.

**Positive control wells:** Add 5  $\mu$ g of the positive control nuclear extract diluted in 20  $\mu$ l of Complete Lysis Buffer per well (2  $\mu$ l of extract in 18  $\mu$ l of Complete Lysis Buffer per well). Please refer to page 8 for recommended positive controls for STAT 1 $\alpha$ , 3, 5A and 5B.

Blank wells: Add 20 µl Complete Lysis Buffer only per well.

- 3. Use the provided adhesive cover to seal the plate. Incubate for 1 hour at room temperature with mild agitation (100 rpm on a rocking platform).
- 4. Wash each well 3 times with 200 µl 1X Wash Buffer. For each wash, flick the plate over a sink to empty the wells, then tap the inverted plate 3 times on absorbent paper towels.

## Step 2: Binding of Primary Antibody

- Add 100 μl of one of the diluted STAT antibodies (1:1000 dilution for STAT1, STAT3, STAT5A and STAT5B in 1X Antibody Binding Buffer) to each well being used.
- 2. Cover the plate and incubate for 1 hour at room temperature without agitation.
- 3. Wash the wells 3 times with 200 µl 1X Wash Buffer (as described in Step 1, No. 4).

## Step 3: Binding of Secondary Antibody

- 1. Add 100 μl diluted HRP-conjugated antibody (1:1000 dilution in 1X Antibody Binding Buffer) to all wells being used.
- 2. Cover the plate and incubate for 1 hour at room temperature without agitation.
- 3. During this incubation, place the Developing Solution at room temperature.
- 4. Wash the wells 4 times with 200  $\mu$ l 1X Wash Buffer (as described in Step 1, No. 4).

## Step 4: Colorimetric Reaction

- 1. Add 100 µl room-temperature Developing Solution to all wells being used.
- 2. Incubate 2-10 minutes at room temperature protected from direct light. Monitor the blue color development in the sample and positive control wells until it turns medium to dark blue. Do not overdevelop.
- 3. Add 100 µl Stop Solution. In presence of the acid, the blue color turns yellow.
- 4. Read absorbance on a spectrophotometer within 5 minutes at 450 nm with a reference wavelength of 655 nm. Blank the plate reader according to the manufacturer's instructions using the blank wells.



Problem/question	Possible cause	Recommendation
No signal or weak signal	Omission of key reagent	Check that all reagents have been added in all wells in the correct order
	Substrate or conjugate is no longer active	Test conjugate and substrate for activity
	Enzyme inhibitor present	Sodium azide will inhibit the peroxidase reaction. Follow our recommendations to prepare buffers
	Plate reader settings not optimal	Verify the wavelength and filter settings in the plate reader
	Incorrect assay temperature	Bring substrate to room temperature
	Inadequate volume of Developing Solution	Check to make sure that correct volume is delivered by pipette
High background in all wells	Developing time too long	Stop enzymatic reaction as soon as the positive wells turn medium-dark blue
	Concentration of anti- bodies is too high	Increase antibody dilutions
	Inadequate washing	Ensure all wells are filled with Wash Buffer and follow washing recommendations
Uneven color development	Incomplete washing of wells	Ensure all wells are filled with Wash Buffer and follow washing recommendations
	Well cross-contami- nation	Follow washing recommendations
High background in sample wells	Too much nuclear extract per well	Decrease amount of nuclear extract down to 1-2 µg/well
	Concentration of anti- bodies is too high	Perform antibody titration to determine optimal working concentration. Start using 1:1000 for primary antibody and 1:5000 for the secondary antibody. The sensitivity of the assay will be decreased
No signal or weak signal in sample wells	Not enough nuclear extract per well	Increase amount of nuclear extract to 50 µg/well
	STAT is poorly acti- vated or inactivated in nuclear fractions	Perform a time course for STAT activation in the studied cell line
	Nuclear extracts are not from correct species	

## Section B: Troubleshooting Guide

# **Proteome Profiler<sup>™</sup> Array**

# Human Phospho-Kinase Array Kit

Catalog Number ARY003B

For the parallel determination of the relative levels of protein phosphorylation.

This package insert must be read in its entirety before using this product. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

# **TABLE OF CONTENTS**

SECTION	PAGE
INTRODUCTION	1
PRINCIPLE OF THE ASSAY	1
TECHNICAL HINTS	1
PRECAUTIONS	1
MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS	2
OTHER SUPPLIES REQUIRED	2
SAMPLE COLLECTION & STORAGE	3
REAGENT PREPARATION	3
ARRAY PROCEDURE	4
ARRAY PROCEDURE SUMMARY	6
DATA ANALYSIS	8
PROFILING KINASE PHOSPHORYLATION IN SAMPLES	9
APPENDIX	

#### MANUFACTURED AND DISTRIBUTED BY:

USA & Canada | R&D Systems, Inc. 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA TEL: (800) 343-7475 (612) 379-2956 FAX: (612) 656-4400 E-MAIL: info@RnDSystems.com

#### **DISTRIBUTED BY:**

UK & Europe | R&D Systems Europe, Ltd. 19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3NB, UK TEL: +44 (0)1235 529449 FAX: +44 (0)1235 533420 E-MAIL: info@RnDSystems.co.uk

China | R&D Systems China Co., Ltd. 24A1 Hua Min Empire Plaza, 726 West Yan An Road, Shanghai PRC 200050 TEL: +86 (21) 52380373 FAX: +86 (21) 52371001 E-MAIL: info@RnDSystemsChina.com.cn

# INTRODUCTION

Analyzing the phosphorylation profiles of kinases and their protein substrates is essential for understanding how cells recognize and respond to changes in their environment. The Human Phospho-Kinase Array is a rapid, sensitive, and economical tool to simultaneously detect the relative levels of phosphorylation of 43 kinase phosphorylation sites and 2 related total proteins without performing numerous immunoprecipitations and Western blots. Each capture antibody was carefully selected using cell lysates prepared from cell lines known to express the target protein.

## **PRINCIPLE OF THE ASSAY**

Capture and control antibodies have been spotted in duplicate on nitrocellulose membranes. Cell lysates are diluted and incubated overnight with the Human Phospho-Kinase Array. The array is washed to remove unbound proteins followed by incubation with a cocktail of biotinylated detection antibodies. Streptavidin-HRP and chemiluminescent detection reagents are applied and a signal is produced at each capture spot corresponding to the amount of phosphorylated protein bound. Refer to the Appendix for a list and coordinates of analytes and controls.

## **TECHNICAL HINTS**

- FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
- This kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources. Substitution of some high intensity chemiluminescent reagents for Chemi Reagents 1 and 2 may cause either increased background or diminished signal depending on the reagent.
- Any variation in sample handling, buffers, operator, pipetting technique, washing technique, and incubation time or temperature can alter the performance of the kit.
- The Human Phospho-Kinase Array membranes are validated for single use only.
- Always use gloved hands and flat-tipped tweezers to handle the membranes.
- Pick up the membranes from the edge on the side with the identification number avoiding the area with the printed antibodies.
- A thorough and consistent wash technique is essential for proper assay performance. Individual arrays should be washed in separate containers to minimize background. Wash Buffer should be removed completely from the membrane before proceeding to the next step.
- Do not allow the membrane to dry out. This will cause high background.
- Avoid microbial contamination of reagents and buffers.
- For a procedure demonstration video, please visit: <u>www.RnDSystems.com/ProteomeProfilerVideo</u>.

# PRECAUTIONS

Chemi Reagents 1 and 2 contain Boric Acid which is suspected of damaging fertility or the unborn child.

Some components in this kit contain ProClin® which may cause an allergic skin reaction. Avoid breathing mist.

Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection. Wash hands thoroughly after handling. Please refer to the MSDS on our website prior to use.

# **MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS**

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

PART	PART #	DESCRIPTION	STORAGE OF OPENED/ RECONSTITUTED MATERIAL
Human Phospho-Kinase Array	894552	8 nitrocellulose membranes (4 Part A, 4 Part B) each containing 43 different capture antibodies printed in duplicate.	Return unused membranes to the foil pouch containing the desiccant pack. Reseal along entire edge of the zip-seal. May be stored for up to 3 months at 2-8 °C.*
Array Buffer 1	895477	21 mL of a buffered protein base with preservatives.	
Array Buffer 2 5X Concentrate	895478	21 mL of a concentrated buffered protein base with preservatives.	
Array Buffer 3	895008	21 mL of a buffered protein base with preservatives.	
Lysis Buffer 6	895561	21 mL of a denaturing buffered solution.	
Wash Buffer Concentrate	895003	2 vials (21 mL/vial) of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservative. <i>May turn yellow over time.</i>	May be stored for up to 3 months at 2-8 °C.*
Detection Antibody Cocktail A, Human Phospho-Kinase Array	894553	1 vial of biotinylated antibody cocktail; lyophilized.	
Detection Antibody Cocktail B, Human Phospho-Kinase Array	894554	1 vial of biotinylated antibody cocktail; lyophilized.	
Streptavidin-HRP	893019	200 µL of streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase.	
Chemi Reagent 1	894287	2.5 mL of stabilized hydrogen peroxide with preservative.	
Chemi Reagent 2	894288	2.5 mL of stabilized luminol with preservative.	
8-Well Multi-dish	607591	Clear 8-well rectangular multi-dish.	
Transparency Overlay Template	607815	1 transparency overlay template for	Store at room temperature.

\* Provided this is within the expiration date of the kit.

## **OTHER SUPPLIES REQUIRED**

- Pipettes and pipette tips
- Gloves
- Phosphate-Buffered Saline (PBS)
- Deionized or distilled water
- Flat-tipped tweezers
- Rocking platform shaker
- Microcentrifuge
- Plastic containers with the capacity to hold 50 mL (for washing the arrays)
- Plastic transparent sheet protector (trimmed to 10 cm x 12 cm and open on three sides)

- Plastic wrap
- Absorbent lab wipes (KimWipes® or equivalent)
- Paper towels
- Autoradiography cassette
- Film developer
- X-ray film (Kodak<sup>®</sup> BioMax<sup>™</sup> Light-1, Catalog # 1788207) or equivalent
- Flatbed scanner with transparency adapter capable of transmission mode
- Computer capable of running image analysis software and Microsoft® Excel

# **SAMPLE COLLECTION & STORAGE**

The sample collection and storage conditions listed below are intended as general guidelines. Sample stability has not been evaluated.

Since the Human Phospho-Kinase Array detects relative phosphorylation levels of individual analytes, it is important to include appropriate control samples.

**Note:** Sample amount may be empirically adjusted to attain optimal sensitivity with minimal background. The suggested starting range for cell lysates is 200-600 µg per array set (A and B).

**Cell Lysates** - Rinse cells with PBS, making sure to remove any remaining PBS before adding lysis buffer. Solubilize cells at 1 x 10<sup>7</sup> cells/mL in Lysis Buffer 6. Pipette up and down to resuspend and rock the lysates gently at 2-8 °C for 30 minutes. Microcentrifuge at 14,000 x g for 5 minutes, and transfer the supernate into a clean test tube. Quantitation of sample protein concentration using a total protein assay is recommended. The maximum allowable lysate volume is 334 µL per array set (A and B). Lysates should be used immediately or aliquoted and stored at  $\leq$  -70 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Thawed lysates should be kept on ice prior to use.

## **REAGENT PREPARATION**

## Bring all reagents to room temperature before use.

Human Phospho-Kinase Array - Eight nitrocellulose membranes; Part A contains 29 antibodies printed in duplicate, and Part B contains 16 antibodies printed in duplicate. Part A and Part B should be used together for optimal analysis efficiency. Handle the membranes only with gloved hands and flat-tipped tweezers.

**Detection Antibody Cocktail A** (red cap) - One vial of lyophilized biotinylated antibodies for use with Part A membranes. Before use, reconstitute Detection Antibody Cocktail A in 100  $\mu$ L of deionized or distilled water.

**Detection Antibody Cocktail B** (blue cap) - One vial of lyophilized biotinylated antibodies for use with Part B membranes. Before use, reconstitute Detection Antibody Cocktail B in 100  $\mu$ L of deionized or distilled water.

**1X Array Buffer 2/3** - Add 2 mL of 5X Array Buffer 2 Concentrate to 8 mL of Array Buffer 3. Prepare fresh for each use.

**1X Wash Buffer** - If crystals have formed in the concentrate, warm the bottles to room temperature and mix gently until the crystals have completey dissolved. Add 40 mL of 25X Wash Buffer Concentrate to 960 mL of deionized or distilled water to prepare 1000 mL of 1X Wash Buffer. *Wash Buffer may turn yellow over time*.

Chemi Reagent Mix - Chemi Reagent 1 and 2 should be mixed in equal volumes within 15 minutes of use. Protect from light. 1 mL of the resultant mixture is required for each set of membranes (A and B).

## **ARRAY PROCEDURE**

# Bring all reagents to room temperature before use. Keep samples on ice. To avoid contamination, wear gloves while performing the procedures.

- 1. Prepare all reagents and samples as directed in the previous sections.
- 2. The Human Phospho-Kinase Array is divided into two parts (A and B) to maximize sensitivity and minimize cross-reactivity. For best results, incubate Part A and Part B in the same lysate preparation but in separate wells of the 8-Well Multi-dish.
- 3. Pipette 1.0 mL of Array Buffer 1 into each well of the 8-Well Multi-dish to be used. Array Buffer 1 serves as a block buffer.
- 4. Using flat-tip tweezers, remove each membrane to be used from between the protective sheets. Place one Part A membrane and one Part B membrane into adjacent wells of the 8-Well Multi-dish and place the lid on the 8-Well Multi-dish. The number on the membrane should be facing upward.

**Note:** Upon contact with Array Buffer 1, the blue dye from the spots will disappear, but the capture antibodies are retained in their specific locations.

- 5. Incubate for one hour on a rocking platform shaker. Orient the tray so that each membrane rocks end to end in its well.
- 6. While the membranes are blocking, prepare samples by diluting the desired quantity of cell lysate (up to  $334 \mu$ L) to a final volume of 2 mL with Array Buffer 1.
- 7. Aspirate Array Buffer 1 from the 8-Well Multi-dish. Add 1.0 mL of the prepared samples to both the Part A and Part B membrane.
- 8. Place the lid on the 8-Well Multi-dish. Incubate overnight at 2-8 °C on a rocking platform shaker.

#### **Note:** A shorter incubation time may be used if optimal sensitivity is not required.

- 9. Carefully remove each membrane and place into individual plastic containers with 20 mL of 1X Wash Buffer. The corresponding parts (A and B) of the membrane should be washed in the **same container** at this point. The recommended container size for washing is approximately 8 x 11 cm. Rinse the 8-Well Multi-dish with deionized or distilled water and dry thoroughly.
- 10. Wash each set (A and B) of membranes with 1X Wash Buffer for 10 minutes on a rocking platform shaker. Repeat two times for a total of three washes.
- 11. For each Part A membrane, add 20 μL of reconstituted Detection Antibody Cocktail A (red cap) to 1.0 mL with 1X Array Buffer 2/3. Pipette 1.0 mL per well of diluted Detection Antibody Cocktail A into the 8-Well Multi-dish.
- 12. Carefully remove each Part A membrane from its wash container. Allow excess Wash Buffer to drain from the membrane. Return the membrane to the 8-Well Multi-dish containing the diluted Detection Antibody Cocktail A.
- 13. For each Part B membrane, add 20 μL of reconstituted Detection Antibody Cocktail B (blue cap) to 1.0 mL with 1X Array Buffer 2/3. Pipette 1.0 mL per well of diluted Detection Antibody Cocktail B into the 8-Well Multi-dish.
- 14. Carefully remove each Part B membrane from its wash container. Allow excess Wash Buffer to drain from the membrane. Return the membrane to the 8-Well Multi-dish containing the diluted Detection Antibody Cocktail B, and cover it with the lid.

- 15. Incubate for 2 hours at room temperature on a rocking platform.
- 16. Carefully remove each membrane and place into individual plastic containers with 20 mL of 1X Wash Buffer. At this point, the corresponding parts (A and B) of the membrane should be washed in **separate containers** to minimize detection antibody cross-reactivity. Rinse the 8-Well Multi-dish with deionized or distilled water and dry thoroughly.
- 17. Wash each membrane with 1X Wash Buffer for 10 minutes on a rocking platform shaker. Repeat two times for a total of three washes.
- 18. Dilute the Streptavidin-HRP in 1X Array Buffer 2/3 using the dilution factor on the vial label. Pipette 1.0 mL into each well of the 8-Well Multi-dish.
- 19. Carefully remove each membrane from its wash container. Allow excess Wash Buffer to drain from the membrane. Return the membranes to the 8-Well Multi-dish containing the diluted Streptavidin-HRP, and cover with the lid. Incubate for 30 minutes at room temperature on a rocking platform shaker.
- 20. Carefully remove each membrane and place into plastic containers with 20 mL of 1X Wash Buffer. The corresponding parts (A and B) of the membrane should be washed in the **same container** at this point. Rinse the 8-Well Multi-dish with deionized or distilled water and dry thoroughly.
- 21. Wash each set (A and B) of membranes with 1X Wash Buffer for 10 minutes on a rocking platform shaker. Repeat two times for a total of three washes.

**Note:** Complete the remaining steps without interruption.

- 22. Carefully remove each membrane from its wash container. Allow excess Wash Buffer to drain from the membrane by blotting the lower edge onto paper towels. Place each membrane on the bottom sheet of the plastic sheet protector with the identification number facing up. Place corresponding Part A and Part B membranes end-to-end.
- 23. Pipette 1 mL of the prepared Chemi Reagent Mix evenly onto each set of membranes.

**Note:** Using less than 1 mL of Chemi Reagent Mix per membrane set may result in incomplete membrane coverage.

- 24. Carefully cover with the top sheet of the plastic sheet protector. Gently smooth out any air bubbles and ensure Chemi Reagent Mix is spread evenly to all corners of each membrane. Incubate for 1 minute.
- 25. Position paper towels on top and sides of plastic sheet protector containing the membranes and carefully squeeze out excess Chemi Reagent Mix.
- 26. Remove the top plastic sheet protector and carefully lay an absorbent lab wipe on top of the membranes to blot off any remaining Chemi Reagent Mix.
- 27. Leaving membranes on the bottom plastic sheet protector, cover the membranes with plastic wrap taking care to gently smooth out any air bubbles. Wrap the excess plastic wrap around the back of the sheet protector so that the membranes and sheet protector are completely wrapped.
- 28. Place the membranes with the identification numbers facing up in an autoradiography film cassette.

**Note:** Use an autoradiography cassette that is not used with radioactive isotope detection.

29. Expose membranes to X-ray film for 1-10 minutes. Multiple exposure times are recommended.

## **ARRAY PROCEDURE SUMMARY**

**Step 1 (Blocking):** Add 1.0 mL of Array Buffer 1 per well. Rock for 1 hour at room temperature.

**Step 2 (Cell Lysates):** Prepare 2.0 mL of diluted cell lysate. Remove Array Buffer 1. Add 1.0 mL of lysate to both Part A and Part B. Incubate overnight at 2-8 °C on a rocking platform shaker.

A001 B001 B002 A002 A003 B003 B004 4004 A001 Lysate B001 B002 A002 Lysate B003 A003 Lysate B004 1004 Lysate A003 A001 B001 B003 A002 A004 B002 B004 8001 A001 A002 B002 A003 B003 A004 B004 DAC-A DAC-B

Step 3: (Wash 1) Wash in 1X Wash Buffer;
20 mL per dish. Wash a total of 3 times;
10 minutes on a rocking platform per wash.
Wash corresponding parts (A and B) together.

**Step 4** (**Detection Antibody Cocktail):** Pipette 1.0 mL of diluted Detection Antibody Cocktail A (DAC-A) into wells for Part A membranes.

Pipette 1.0 mL of diluted Detection Antibody Cocktail B (DAC-B) into wells for Part B membranes.

Transfer the membranes to appropriate wells. Incubate for 2 hours at room temperature on a rocking platform.

## ARRAY PROCEDURE SUMMARY CONTINUED

Step 5 (Wash 2): Wash in 1X Wash Buffer; 20 mL per dish. Wash a total of 3 times; 10 minutes on a rocking platform shaker per wash. Wash all membranes separately.

**Step 6 (Streptavidin-HRP):** Pipette 1.0 mL of diluted Streptavidin- HRP into each well. Transfer the membranes to the appropriate wells. Incubate for 30 minutes at room temperature on a rocking platform.

**Step 7 (Wash 3):** Wash in 1X Wash Buffer; 20 mL per dish. Wash a total of 3 times; 10 minutes per wash. Wash corresponding parts (A and B) together.

**Step 8 (Signal Detection):** Arrange the membranes on a sheet protector. Apply the Chemi Reagent Mix and expose to film.



## **DATA ANALYSIS**

The positive signals seen on developed film can be quickly identified by placing the transparency overlay on the array image and aligning it with the pairs of reference spots in the corners of each membrane (two pairs on the left side of Part A and one pair on the right side of Part B). The stamped identification numbers on the membranes should be placed on the left hand side. The location of controls and capture antibodies is listed in the Appendix. It may be necessary to adjust the position of the transparency overlay template if the two parts of the membrane are not aligned.

**Note:** Reference spots are included to align the transparency overlay template and to demonstrate that the array has been incubated with Streptavidin-HRP during the assay procedure.

Pixel densities on developed X-ray film can be collected and analyzed using a transmissionmode scanner and image analysis software.

- 1. Create a template to analyze pixel density in each spot of the array.
- 2. Export signal values to a spreadsheet file for manipulation in a program such as Microsoft Excel.
- 3. Determine the average signal (pixel density) of the pair of duplicate spots representing each phosphorylated kinase protein.
- 4. Subtract an averaged background signal from each spot. Use a signal from a clear area of the array or negative control spots as a background value.
- 5. Compare corresponding signals on different arrays to determine the relative change in phosphorylated kinase proteins between samples.



## Human Phospho-Kinase Array Coordinates

This image is not to scale. It is for coordinate reference only. Please use the transparency overlay for analyte identification.

# **PROFILING KINASE PHOSPHORYLATION IN SAMPLES**

The Human Phospho-Kinase Array detects phosphorylated proteins in cell lysates.

Parts A and B of each array were incubated with 200 µg of cell lysate. Data shown are from a 5 minute exposure to film.



## Figures A and B:

- **A.** MCF-7 human breast cancer cells were either left untreated or exposed to 50 J/m<sup>2</sup> of UV light followed by a 4 hour recovery before lysis.
- **B.** A431 human epithelial carcinoma cells were either left untreated or treated with 200 ng/mL recombinant human (rh) EGF (R&D Systems, Catalog # 236-EG) for 5 minutes.

## **PROFILING KINASE PHOSPHORYLATION IN SAMPLES** CONTINUED

C



## Figures C and D:

- C. MCF-7 human breast cancer cells were either left untreated or treated with 100 ng/mL of rhIGF-I (R&D Systems, Catalog # 291-G1) for 1 hour.
- D. CCD-1070Sk human foreskin fibroblast cells were either left untreated or treated with 100 ng/mL rhPDGF-BB (R&D Systems, Catalog # 220-BB) for 5 minutes.

# **PROFILING KINASE PHOSPHORYLATION IN SAMPLES** CONTINUED





## Figures E and F:

- **E.** HeLa human cervical epithelial carcinoma cells were either left untreated or treated with 200 nM PMA for 20 minutes.
- F. MCF-7 human breast cancer cells were either left untreated or treated with 1  $\mu$ M Camptothecin (CPT) for 4 hours.

## **PROFILING KINASE PHOSPHORYLATION IN SAMPLES** CONTINUED



Figure G: Jurkat human acute T cell leukemia cells were either left untreated or treated with  $2 \text{ mM H}_2O_2$  for 2 minutes.
# APPENDIX

Refer to the table below for the Human Phospho-Kinase Array coordinates. DuoSet IC catalog numbers are provided for follow-up analysis of array data when desired.

Membrane/ Coordinate	Target/Control	Phosphorylation Site	DuoSet® IC (Total) ELISA Development System	DuoSet <sup>®</sup> IC (Phospho) ELISA Development System
A-A1, A2	Reference Spot			
A-A3, A4	ρ38α	T180/Y182	DYC8691B	DYC869B
A-A5, A6	ERK1/2	T202/Y204, T185/ Y187		DYC1018B
А-А7, А8	JNK 1/2/3	T183/Y185, T221/ Y223	DYC1205	DYC1387
A-A9, A10	GSK-3α/β	S21/S9	DYC2157	DYC2630
B-A13, A14	p53	S392	DYC1043	DYC2996
B-A17, A18	Reference Spot			
A-B3, B4	EGF R	Y1086	DYC1854	
A-B5, B6	MSK1/2	S376/S360		
A-B7, B8	ΑΜΡΚα1	T183	DYC3197	DYC3528
A-B9, B10	Akt 1/2/3	S473		DYC887B
B-B11, B12	Akt 1/2/3	T308		
B-B13, B14	p53	S46	DYC1043	DYC1489
A-C1, C2	TOR	S2448		DYC1665
A-C3, C4	CREB	S133		DYC2510
A-C5, C6	HSP27	S78/S82	DYC1580	DYC2314
A-C7, C8	ΑΜΡΚα2	T172		
A-C9, C10	β-Catenin		DYC1329	
B-C11, C12	p70 S6 Kinase	T389	DYC8962	DYC896
B-C13, C14	p53	S15	DYC1043	DYC1839
B-C15, C16	c-Jun	S63		
A-D1, D2	Src	Y419		DYC2685
A-D3, D4	Lyn	Y397		DYC3936
A-D5, D6	Lck	Y394		
A-D7, D8	STAT2	Y689		
A-D9, D10	STAT5a	Y694		
B-D11, D12	p70 S6 Kinase	T421/S424	DYC8962	DYC8965
B-D13, D14	RSK1/2/3	\$380/\$386/\$377		DYC889B
B-D15, D16	eNOS	S1177		

# **APPENDIX** CONTINUED

Membrane/ Coordinate	Target/Control	Phosphorylation Site	DuoSet® IC (Total) ELISA Development System	DuoSet <sup>®</sup> IC (Phospho) ELISA Development System
A-E1, E2	Fyn	Y420		
A-E3, E4	Yes	Y426		DYC3929
A-E5, E6	Fgr	Y412		
A-E7, E8	STAT6	Y641		
A-E9, E10	STAT5b	Y699		
B-E11, E12	STAT3	Y705		DYC4607B
B-E13, E14	p27	T198	DYC2256	
B-E15, E16	PLC-γ1	Y783		
A-F1, F2	Hck	Y411		
A-F3, F4	Chk-2	T68		DYC1626
A-F5, F6	FAK	Y397	DYC4467	DYC4528
A-F7, F8	PDGF Rβ	Y751	DYC385	DYC3096
A-F9, F10	STAT5a/b	Y694/Y699		
B-F11, F12	STAT3	S727		
B-F13, F14	WNK1	T60		DYC4720
B-F15, F16	РҮК2	Y402		
A-G1, G2	Reference Spot			
A-G3, G4	PRAS40	T246		DYC6890
A-G9, G10	PBS (Negative Control)			
B-G11, G12	HSP60		DYC1800	
B-G17, G18	PBS (Negative Control)			

All trademarks and registered trademarks are property of their respective owners.

©2014 R&D Systems, Inc.



# iScript<sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit

25 x 20 μl reactions170-8890100 x 20 μl reactions170-8891For research purposes onlyStore at -20°C (not frost-free)

iScript cDNA synthesis kit provides a sensitive and easy-to-use solution for two-step RT-PCR. This kit includes just three tubes — comprehensive of reagents required for successful reverse transcription.

The iScript reverse transcriptase is RNase H+, which provides greater sensitivity than RNase H- enzymes in quantitative PCR. iScript is a modified MMLV-derived reverse transcriptase, optimized for reliable cDNA synthesis over a wide dynamic range of input RNA. The enzyme is provided preblended with RNase inhibitor. The unique blend of oligo(dT) and random hexamer primers in the iScript reaction mix works exceptionally well with a wide variety of targets. This blend is optimized for the production of targets <1kb in length.

iScript cDNA synthesis kit produces excellent results in both real time and conventional RT-PCR.

### **Storage and Stability**

Store the iScript<sup>™</sup> cDNA synthesis kit at -20°C in a constant-temperature freezer. When stored under these conditions, the kit components are stable for a minimum of one year after ship date. Nuclease-free water can be stored at room temperature.

### Important Note

We have recently made improvements to our manufacturing procedure, in order to ensure that you receive the highest quality product we can deliver. Kits whose six-digit lot number begins with a "2" are not compatible with kits whose six-digit lot number begins with a "1". Please make note of this distinction if you have multiple lots of this kit in storage.

### **Kit Contents**

Reagents	Volume	
25 Reaction Kit		
5x iScript reaction mix	100 µl	
Nuclease-free water	1.5 ml	
iScript reverse transcriptase	25 µl	
100 Reaction Kit		
5x iScript reaction mix	400 µl	
Nuclease-free water	1.5 ml	

## **Reaction Setup**

Please Note

The 5x iScript reaction mix may generate some precipitation upon thawing; this does not affect the quality of the mixture. If you do experience precipitation, please mix thoroughly to resuspend and use as directed below.

Components	Volume per Reaction
5x iScript reaction mix	4 µl
iScript reverse transcriptase	1 µl
Nuclease-free water	x µl
RNA template (100 fg to 1 µg total RNA)*	x µl

Total volume

20 µl

## **Reaction Protocol**

Incubate complete reaction mix: 5 minutes at 25°C 30 minutes at 42°C 5 minutes at 85°C Hold at 4°C (optional)

### **Reagents and Materials Not Supplied**

Reagents for PCR or real-time PCR				
Such as:				
iTaq™ DNA polymerase, 170-8870				
iQ <sup>™</sup> supermix, 170-8860, or				
iQ™ SYBR® Green supermix, 170-8880				
Pipet tips, aerosol barrier tips				
Such as:				
Xcluda <sup>™</sup> style B, 211-2006				
Nuclease-free tubes				
0.2 ml thin-wall tubes	TWI-0201			
0.2 ml thin-wall tubes	HSP-9601 (Low-Profile)			
	HSS-9601 (Full Height)			
RNA purification kit				
Suchas				

Such as: Aurum<sup>™</sup> total RNA mini kit, 732-6820 or Aurum total RNA kit, 2 x 96 well, 732-6800

# Recommendations for Optimal Results Using the iScript cDNA Synthesis Kit

The maximum amount of the cDNA reaction that is recommended for downstream PCR is one-tenth of the reaction volume, typically 2 µl.

\*When using larger amounts of input RNA (>1  $\mu$ g), the reaction should be scaled up, e.g., 40  $\mu$ l reaction for 2  $\mu$ g, or 100  $\mu$ l reaction for 5  $\mu$ g to ensure optimum synthesis efficiency.

Bio-Rad Laboratories, Inc. is licensed by Moleculer Probes, Inc. to sell reagents containing SYBR Green I for use in real-time PCR, for reasearch purposes only. SYBR Green is a registered trademark of Molecular Probes, Inc. iScript, iTaq, iQ, iProof, Xcluda, and Aurum are trademarks of Bio-Rad Laboratories.

Bio-Rad Laboratories, Inc. 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547 510-741-1000 Anexo IV. Curriculum Vitae

### Formación Académica

Licenciada en Biología. Universidad de La Laguna (2009)

Máster en Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria. IUSA, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (2011)

### Publicaciones

CM363, a novel naphthoquinone derivative which acts as multikinase modulator and overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia.

Borja Guerra, Patricia Martín-Rodríguez, Juan Carlos Díaz-Chico, Grant McNaughton-Smith, Sandra Jiménez-Alonso, Idaira Hueso-Falcón, Juan Carlos Montero, Raquel Blanco, Javier León, Germán Rodríguez-González, Ana Estévez-Braun, Atanasio Pandiella, Bonifacio Nicolás Díaz-Chico, Leandro Fernández-Pérez.

Oncotarget. 2017. 8 (18): 29679-29698

5-Ethynylarylnaphthalimides as antitumor agents: Synthesis and biological evaluation.

Patricia Quintana-Espinoza, Pedro Martín-Acosta, Ángel Amesty, Patricia Martín-Rodríguez, Isabel Lorenzo-Castrillejo, Leandro Fernández-Pérez, Félix Machín, Ana Estévez-Braun. Bioorg Med Chem. 2017. 25: 1976-1983 Indium catalyzed solvent-free multicomponent synthesis of cytotoxic dibenzo [a,h] anthracenes from aldehydes, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, and 2-naphthol.

Idaira Hueso-Falcón, Ángel Amesty, Patricia Martín, Matías López-Rodríguez,

*Leandro Fernández-Pérez, Ana Estévez-Braun.* Tetrahedron. 2014. 70 (45): 8480-8487

Synthesis and study of antiproliferative, antitopoisomerase II, DNAintercalating and DNA-damaging activities of arylnaphthalimides. *Quintana-Espinoza P, García-Luis J, Amesty A, Martín-Rodríguez P, Lorenzo-Castrillejo I, Ravelo AG, Fernández-Pérez L, Machín F, Estévez-Braun A.* Bioorg Med Chem. 2013. 1 (21): 6484-6495

Cytotoxic triterpenoides from *Maytenus retusa*. Oramas-Royo SM, Chavez H, Martín-Rodríguez P, Fernández-Pérez L, Ravelo AG, Estévez-Braun A. J. Nat Prod. 2010. 73(12): 2029-2034

Synthesis and in vitro antiprotozoal evaluation of substituted phenalenone analogues.

Rosquete LI, Cabrera-Serra MG, Piñero JE, Martín-Rodríguez P, Fernández-Pérez L, Luis JG, McNaughton-Smith G, Abad-Grillo T. Bioorg Med Chem. 2010. 18: 4530-4534

### Aportaciones a congresos

Phenotypic- and target- based strategies identify naphthoquinone derivatives that induce apoptosis in human cronic myelonenous leukemia cells.
Leandro Fernández-Pérez, Patricia Martín-Rodríguez, Idaira Hueso-Falcón, Borja Guerra, Juan C. Díaz-Chico, Haideé Aranda-Tavío, Laura Rodrigo-González, Francisco Estévez-Rosas, José Quintana-Aguiar, Nicolás Díaz-Chico, Ana Estévez-Braun.
VIII Spanish Drug Discovery Network Meeting
Póster
Santiago de Compostela, España. Noviembre 2016

A novel naphthoquinone derivative inhibits viability, blocks cell cycle progression and induces apoptosis in human chronic myelogenous leukemia cells.

Guerra B, Martín-Rodríguez P, Díaz-Chico JC, McNaughton-Smith G, Jiménez-Alonso S, Hueso-Falcón I, Montero JC, Blanco R, León J, Rodríguez FG, Estévez-Braun A, Pandiella A, Díaz-Chico BN, Fernández-Pérez L.

7th European Congress of Pharmacology Estambul, Turquía. Junio 2016

Evaluación farmacológica preclínica de nuevos productos bioactivos con aplicaciones como anti-tumorales.

Patricia Martín-Rodríguez, Borja Guerra, Juan C. Díaz-Chico, Leandro Fernández Pérez.

Primer Encuentro de Investigación Biomédica y Sanitaria de Canarias Comunicación oral

Las Palmas de Gran Canaria, España. Abril 2016

Synthesis and Biological evaluation of 2-hidroxi-1,4-naphthoquinone-based derivatives as novel inhibitors of Signal Transductor and Activator of Transcription (STAT5).

Martín-Rodríguez P., Guerra B., Hueso-Falcón I., Díaz-Chico J., Amesty Á., López-Rodríguez M., Gutiérrez-Ravelo Á., Fernandez-Perez L. 17th World Congress of Basic & Clinical Pharmacology Ciudad del Cabo, Sudáfrica. Julio 2014

Biological activities of a novel series of compounds as DNA Topoisomerase II inhibitors.

Martín Rodríquez P, Estévez Braun A, McNaughton Smith G, Gutiérrez Ravelo A, Pérez Sacau E, Quintana Espinosa P, Jiménez Alonso S, Fernández Pérez L, Díaz Chico N.

7<sup>th</sup> YCIC (Young Cancer Investigators of the Canary Islands) and 4<sup>th</sup> YBIM (Young Biomedical Investigators of the Macaronesia)

Comunicación oral

La Laguna, Tenerife, España . Marzo 2011

Screening of novel antitumoral JAK-STAT inhibitors using human erythroleukemia (HEL) cells.

Mateos Díaz C.J, Martín Rodríguez P, McNaughton Smith G, Estévez Braun A, Pérez Sacau E, Lorenzo Villegas D, Díaz Chico J.C, Gutiérrez Ravelo A, Díaz Chico N, Fernández Pérez L.

7th YCIC (Young Cancer Investigators of the Canary Islands) and 4th YBIM (Young Biomedical Investigators of the Macaronesia) Póster

La Laguna, Tenerife, España. Marzo 2011.

Synthesis and antitumoral activity of 5-aromatic substituted naphthalimides. *Quintana Espinoza P, Fernández Braña M, Martín Rodríguez P, Fernández Pérez L, Machín F, Gutiérrez Ravelo A, Estévez Braun A.*7th YCIC (Young Cancer Investigators of the Canary Islands) and 4th YBIM (Young Biomedical Investigators of the Macaronesia)
Póster
La Laguna, Tenerife, España. Marzo 2011.

Cytotoxic metabolites from Maytenus retusa.

Oramas-Royo SM, Chavez Orellana H, Martín-Rodríguez P, Fernández-Pérez L, Gutiérrez Ravelo A, Estévez-Braun A.

Congreso: 7th YCIC (Young Cancer Investigators of the Canary Islands) and 4th YBIM (Young Biomedical Investigators of the Macaronesia) Póster

La Laguna, Tenerife, España. Marzo 2011.

#### Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 18), pp: 29679-29698

**Research Paper** 

# CM363, a novel naphthoquinone derivative which acts as multikinase modulator and overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia

Borja Guerra<sup>1,2,3,\*</sup>, Patricia Martín-Rodríguez<sup>1,\*</sup>, Juan Carlos Díaz-Chico<sup>1,3</sup>, Grant McNaughton-Smith<sup>4</sup>, Sandra Jiménez-Alonso<sup>3,7</sup>, Idaira Hueso-Falcón<sup>4</sup>, Juan Carlos Montero<sup>5</sup>, Raquel Blanco<sup>6</sup>, Javier León<sup>6</sup>, Germán Rodríguez-González<sup>4</sup>, Ana Estévez-Braun<sup>3,7</sup>, Atanasio Pandiella<sup>5</sup>, Bonifacio Nicolás Díaz-Chico<sup>1,3,4</sup>, Leandro Fernández-Pérez<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias BioPharm Laboratory, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Epaña

<sup>2</sup>Unidad de Apoyo a la Docencia en Enfermería-Fuerteventura, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España

<sup>3</sup>Instituto Canario de Investigación sobre el Cáncer, España

<sup>4</sup>Centro Atlántico del Medicamento, España

<sup>5</sup>Centro de Investigación del Cáncer, CSIC, Universidad de Salamanca, España

<sup>6</sup>Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, CSIC-Universidad de Cantabria, España

<sup>7</sup>Departamento de Química Orgánica, Instituto de Bio-Orgánica Antonio González, Universidad de la Laguna, España

\*These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Leandro Fernández-Pérez, email: leandrofco.fernandez@ulpgc.es

Keywords: leukemia, naphthoquinone, Bcrl-Abl-Stat5, imatinib resistance

Received: April 23, 2016 Accepted: July 28, 2016 Published: August 19, 2016

Copyright: Guerra et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

#### ABSTRACT

Human Chronic Myelogenous Leukemia (CML) is a hematological stem cell disorder which is associated with activation of Bcr-Abl-Stat5 oncogenic pathway. Direct Bcr-Abl inhibitors are initially successful for the treatment of CML but over time many patients develop drug resistance. In the present study, the effects of CM363, a novel naphthoquinone (NPQ) derivative, were evaluated on human CML-derived K562 cells. CM363 revealed an effective cell growth inhibition (IC50 =  $0.7 \pm 0.5 \mu$ M) by inducing cancer cells to undergo cell cycle arrest and apoptosis. CM363 caused a dose- and time-dependent reduction of cells in G0/G1 and G2/M phases. This cell cycle arrest was associated with increased levels of cyclin E, pChk1 and pChk2 whereas CM363 downregulated cyclin B, cyclin D3, p27, pRB, Wee1, and BUBR1. CM363 increased the double-strand DNA break marker yH2AX. CM363 caused a timedependent increase of annexin V-positive cells, DNA fragmentation and increased number of apoptotic nuclei. CM363 triggered the mitochondrial apoptotic pathway as reflected by a release of cytochrome C from mitochondria and induction of the cleavage of caspase-3 and -9, and PARP. CM363 showed multikinase modulatory effects through an early increased JNK phosphorylation followed by inhibition of pY-Bcrl-Abl and pY-Stat5. CM363 worked synergistically with imatinib to inhibit cell viability and maintained its activity in imatinib-resistant cells. Finally, CM363 (10 mg/Kg) suppressed the growth of K562 xenograft tumors in athymic mice. In summary, CM363 is a novel multikinase modulator that offers advantages to circumvent imanitib resistance and might be therapeutically effective in Bcrl-Abl-Stat5 related malignancies.

#### Bioorganic & Medicinal Chemistry 25 (2017) 1976-1983



Contents lists available at ScienceDirect

## **Bioorganic & Medicinal Chemistry**

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

# 5-Ethynylarylnaphthalimides as antitumor agents: Synthesis and biological evaluation



# CrossMark

Patricia Quintana-Espinoza<sup>a,1</sup>, Pedro Martín-Acosta<sup>a,1</sup>, Ángel Amesty<sup>a</sup>, Patricia Martín-Rodríguez<sup>b</sup>, Isabel Lorenzo-Castrillejo<sup>c</sup>, Leandro Fernández-Pérez<sup>b</sup>, Félix Machín<sup>c,\*</sup>, Ana Estévez-Braun<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González (CIBICAN), Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez 2, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>b</sup> Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Departamento de Ciencias Clínicas, BIOPHARM, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain <sup>c</sup> Unidad de Investigación, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Carretera del Rosario 145, 38010 Santa Cruz de Tenerife, Spain

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 10 January 2017 Revised 9 February 2017 Accepted 10 February 2017 Available online 13 February 2017

Keywords: Naphthalimides Antiproliferative activity Topoisomerase II DNA damage Saccaromyces cereviciae

#### ABSTRACT

A set of 5-ethynylarylnaphthalimides was synthesized by Sonogashira cross-coupling reactions and evaluated for antiproliferative and antitopoisomerase II *in vitro* activities. Furthermore docking studies of these molecules as DNA-intercalators were carried out and the *in vivo* DNA-damaging activity was also determined with the model organism *Saccharomyces cerevisiae*. From the obtained results three naphthalimides **6**, **13** and **14** showed strong topoisomerase II inhibitory activity. These three molecules also presented good docking scores as DNA-intercalators using a self-complementary oligodeoxynucleotide d (ATGCAT)<sub>2</sub> as a model, and compounds **13** and **14** were among the most cytotoxic in the *in vivo* DNAdamaging activity.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Small-molecule-mediated DNA targeting represents one of the most effective approaches for the development of chemotherapeutics. Naphthalimide derivatives constitute interesting scaffolds because of their well characterized DNA-binding properties.<sup>1,2</sup> Amonafide (Fig. 1) is one of the most widely studied naphthalimides, and its antitumor activity seems to be related to poisoning the nuclear enzyme topoisomerase II to generate DNA-strand breaks.<sup>3,4</sup> Amonafide showed excellent activity in clinical phase II breast cancer trials, but it failed in clinical phase III trials because of its unpredictable side effects on dose-limiting bone marrow toxicity due to its metabolization to N-acetyl-amonafide.<sup>5,6</sup> To avoid the side effect of amonafide several strategies have been carried out. Thus, several N-substituted amonafide derivatives were synthesized by Kiss<sup>7</sup> and Quian.<sup>8</sup> Some heterocyclic-fused naphthalimides such as thiazonaphthalimides, 9-11 or benzopyrannaphthalimides<sup>12</sup> were also prepared. Other approach was the preparation of 5-non-amino aromatic substituted naphthalimides.<sup>13,14</sup> In this sense our group prepared and designed a series

<sup>1</sup> These authors equally contributed to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.024 0968-0896/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved. of arylnaphthalimides,<sup>14</sup> and we found that all synthesized naphthalimides but those carrying H-bond donor groups, strongly inhibited Topo II, and they were likely generating DNA double strand breaks (DSB) in vivo as determined by assays with the model organism Saccharomyces cerevisiae. These compounds were able to arrest yeast cells in G2, promote the formation of Rad52 foci in vivo and made *rad52* mutants hypersensitive. Based on these previous results and because amonafide, together with cytarabine has been introduced into phase III clinical trial against secondary acute myeloid leukemia<sup>15</sup> we encouraged the study of antitumor properties of new 5-ethynylarylnaphthalimides, since the acetylene bond itself is believed to improve the intercalating properties.<sup>16</sup> Thus the naphthalimide moiety can be attached to a variety of substituted aromatic rings via an acetylene bridge, which provides the necessary structural rigidity and twisting ability and still unites the aromatic structures.

#### 2. Results and discussion

Naphthalimides (**4–14**) were synthesized from the commercial 1.8-naphthalic anhydride (**1**) which was quantitatively and selectively converted into 3-iodo-1.8-naphthalic anhydride (**2**) by using of iodine in the presence of  $Ag_2SO_4/H_2SO_4$  (Scheme 1).<sup>14</sup> The treatment of **2** with N,N-dimethyl-ethane-1,2-diamine yielded

<sup>\*</sup> Corresponding authors.

*E-mail addresses:* fmacconw@gmail.com (F. Machín), aestebra@ull.es (A. Estévez-Braun).

### **RTICLE IN PRESS**

#### Tetrahedron xxx (2014) 1-8



Contents lists available at ScienceDirect

# Tetrahedron

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tet

# Indium catalyzed solvent-free multicomponent synthesis of cytotoxic dibenzo[*a*,*h*]anthracenes from aldehydes, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, and 2-naphthol

Idaira Hueso-Falcón<sup>a</sup>, Ángel Amesty<sup>a</sup>, Patricia Martín<sup>b</sup>, Matías López-Rodríguez<sup>a</sup>, Leandro Fernández-Pérez<sup>b</sup>, Ana Estévez-Braun<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González (CIBICAN), Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez 2, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain <sup>b</sup> Departamento de Ciencias Clínicas-Unidad de Farmacología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Unidad Asociada de Biomedicina ULPGC-IIBM "Alberto Sols"-CSIC, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 4 August 2014 Received in revised form 22 September 2014 Accepted 23 September 2014 Available online xxx

Keywords: Multicomponent reaction Indium trichloride Naphthoquinone Cytotoxicity

#### 1. Introduction

Multicomponent reactions (MCRs) are one-pot reactions employing more than two starting materials, where most of the atoms of them are incorporated in the final product. Several descriptive tags are regularly attached to MCRs: they are atom economic, efficient since the product is formed in one-step, they are also convergent and exhibit a very high bond-forming-index (BFI). Furthermore, the rapid and easy access to biologically relevant compounds by MCRs, and its scaffold diversity has been recognized by the synthetic community in industry and academia, as a preferred method to design and discover small molecular weight compounds with biological activity.<sup>1</sup>

Quinones and β-naphthols are considered privileged structures<sup>2</sup> since they are occurring fragments in natural products and drugs exhibiting a broad spectrum of biological activities. Both structures have been involved in different MCRs. For example, the preparation of Betti bases by the three-component reaction of aromatic aldehyde, 2-naphthol, and acetonitrile (or benzamide) catalyzed by 1-methyl-3-(2-(sulfooxy)ethyl)-1H-imidazol-3-ium has been recently

[a,i]xanthene-diones.5 With respect to the quinones, our research group has carried out several multicomponent reactions using 2-hydroxy-1,4-quinone moiety in order to obtain antitumoral and antibacterial compounds based on quinone cores fused to heterocyclic rings.<sup>6</sup> In our approach 2-hydroxy-1,4-quinone moiety is employed as an adequate synthetic equivalent to a 1,3-dicarbonyl compound. In this case, the Knoeve-

nagel condensation with aldehydes leads to a reactive intermediate quinone methide (QM),<sup>7</sup> which is susceptible to be trapped by diverse electron rich alkenes as dienophiles via hetero Diels-Alder reactions, <sup>6a–d</sup> or reacts with diverse nucleophiles via Michael addition.<sup>6e–g</sup> As part of an ongoing development of efficient protocols for the

reported.<sup>3</sup> A facile, one-pot, pseudo four-component catalyst- and solvent-free synthesis of novel benzopyrano[2,3-b] pyridines was

achieved through the reaction of salicylaldehyde, naphthols, and

malononitrile.<sup>4</sup> Several xanthene derivatives have been also obtained

using a variety of hydroxynaphthols such as 2-naphthol, 2,7-

dihydroxy-naphthalene, and 2,6-dihydroxynaphthalene, which re-

act with aldehydes, and 2-hydroxynaphthalen-1,4-dione using cat-

alytic sulfuric acid in water under reflux to yield a variety of dibenzo

preparation of substituted heterocyclic quinones, and in a continuation of our work on MCRs, we report the preparation of dibenzo [a,h]anthracenes. These crossed adducts were prepared using

http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2014.09.076 0040-4020/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Hueso-Falcón, I.; et al., Tetrahedron (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2014.09.076

#### ABSTRACT

A series of dibenzo[a,h]anthracene derivatives were synthesized through a straightforward, one-pot protocol based on a three-component reaction with 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, aromatic aldehydes, and 2-naphthol as synthetic inputs, using InCl<sub>3</sub> a catalyst under solvent-free conditions. Most of the obtained ortho-quinonic adducts were cytotoxic against HEL and MCF-7 tumoral cell lines. © 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Corresponding author. Tel./fax: +34 922318576; e-mail address: aestebra@ull.es (A. Estévez-Braun).

#### Bioorganic & Medicinal Chemistry 21 (2013) 6484-6495



Contents lists available at ScienceDirect

# **Bioorganic & Medicinal Chemistry**

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc



# Synthesis and study of antiproliferative, antitopoisomerase II, DNA-intercalating and DNA-damaging activities of aryInaphthalimides



Patricia Quintana-Espinoza <sup>a,b</sup>, Jonay García-Luis <sup>b,c,†,‡</sup>, Ángel Amesty <sup>a,b</sup>, Patricia Martín-Rodríguez <sup>b,d,e</sup>, Isabel Lorenzo-Castrillejo <sup>c</sup>, Angel G. Ravelo <sup>a,b</sup>, Leandro Fernández-Pérez <sup>b,d</sup>, Félix Machín <sup>b,c,\*</sup>, Ana Estévez-Braun <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Universitario de Bio-Orgánica 'Antonio González', Centro de Investigaciones Biomédicas de Canarias (CIBICAN), Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez 2, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>b</sup> Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC), Spain<sup>†</sup>

<sup>c</sup> Unidad de Investigación, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Carretera del Rosario, 145, 38010 Santa Cruz de Tenerife, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Ciencias Clínicas-Unidad de Farmacología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Las Palmas de G.C., Unidad Asociada de Biomedicina ULPGC-IIBM 'Alberto Sols'-CSIC, Las Palmas de G.C., Spain

<sup>e</sup> Centro Atlántico del Medicamento, Spain<sup>‡</sup>

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 1 July 2013 Revised 20 August 2013 Accepted 21 August 2013 Available online 29 August 2013

Keywords: AryInaphthalimides Antiproliferative activity Topoisomerase II DNA damage Saccharomyces cerevisiae

#### ABSTRACT

A series of arylnaphthalimides were designed and synthesized to overcome the dose-limiting cytotoxicity of N-acetylated metabolites arising from amonafide, the prototypical antitumour naphthalimide whose biomedical properties have been related to its ability to intercalate the DNA and poison the enzyme Topoisomerase II. Thus, these arylnaphthalimides were first evaluated for their antiproliferative activity against two tumour cell lines and for their antitopoisomerase II in vitro activities, together with their ability to intercalate the DNA in vitro and also through docking modelization. Then, the well-known DNA damage response in *Saccharomyces cerevisiae* was employed to critically evaluate whether these novel compounds can damage the DNA in vivro. By performing all these assays we conclude that the 5arylsubstituted naphthalimides not only keep but also improve amonafide's biological activities.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Naphthalimides, a class of compounds that bind to DNA by intercalation have shown high anticancer activity against a variety of murine and human tumor cells.<sup>1-4</sup> Two representative compounds, mitonafide and amonafide (Fig. 1), have reached clinical trials as potential anticancer agents.<sup>5,6</sup> However, amonafide, although effective in its phase 2 clinical trials when administered either alone or in combination, suffered from the dose-limiting bone marrow toxicity caused by the toxic *N*-acetyl-amonafide generated through N-acetylation by the N-acetyltransferase 2 (NAT2).<sup>7,8</sup> Amonafide is a DNA intercalating agent that induces apoptotic signalling by promoting topoisomerase II (Topo II)-mediated DNA cleavage (i.e., it 'poisons' the enzyme).<sup>9</sup> Topo II is

a nuclear enzyme that regulates the topological structure of chromatin. It is mainly involved in chromosome condensation and sister chromatid decatenation in mitosis. Topo II poisons are well validated chemotherapy agents.<sup>10</sup> Epipodophyllotoxins (etoposide), aminoacridines (amsacrine) and anthracyclines (doxorubicin, daunorubicin, etc.) are all potent Topo II poisons. Amonafide is distinct from other Topo II poisons in being able to evade Glycoprotein 1 (PgP) and related transporters responsible for multi-drug resistance.<sup>11</sup>

With the aim of accessing to less cytotoxic naphthalimides against bone-marrow while keeping their antitumoral activities, we synthesized several non-amino substituted naphthalimides. In this paper, we describe the preparation and biological evaluation of a series of aromatic substituted naphthalimides. We include the antiproliferative activity against two cancer cell lines of the synthesized naphthalimides together with the antitopoisomerase I and II in vitro activities. Besides, we carried out docking studies in order to further confirm the ability of the aryInaphthalimides to intercalate the DNA and thus complement the results obtained in vitro during the topoisomerase (I and II)-mediated relaxation.

<sup>\*</sup> Corresponding authors. Tel.: +34 922318576; fax: +34 922318571.

*E-mail addresses:* fmacconw@gmail.com (F. Machín), aestebra@ull.es (A. Esté-vez-Braun).

<sup>†</sup> http://www.icic.es.

<sup>&</sup>lt;sup>‡</sup> http://www.ceamedsa.com.

<sup>0968-0896/\$ -</sup> see front matter @ 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.08.039

Bioorganic & Medicinal Chemistry 18 (2010) 4530-4534

FISEVIEI



# **Bioorganic & Medicinal Chemistry**

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc



# Synthesis and in vitro antiprotozoal evaluation of substituted phenalenone analogues

Laura I. Rosquete<sup>a</sup>, M. Gabriela Cabrera-Serra<sup>b</sup>, José E. Piñero<sup>b</sup>, Patricia Martín-Rodríguez<sup>c,d</sup>, Leandro Fernández-Pérez<sup>c,d</sup>, Javier G. Luis<sup>a</sup>, Grant McNaughton-Smith<sup>a,d,\*</sup>, Teresa Abad-Grillo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Universitario de Bio-Orgánica 'Antonio González', Universidad de La Laguna, Avda. Fco., Sánchez 2, 38206 La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain
<sup>b</sup> Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Las Islas Canarias, Laboratorio de Quimioterapias de Protozoos, Universidad de La Laguna, Avda. Francisco Sánchez s/n, 38206 La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain

<sup>c</sup> Department of Clinical Sciences, Molecular and Translational Endocrinology Group, University of Las Palmas de GC-Cancer Research Institute of the Canary Islands (ICIC), Spain <sup>d</sup> CEAMED, SA, Spain

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 29 October 2009 Revised 15 April 2010 Accepted 21 April 2010 Available online 28 April 2010

*Keywords:* Synthesis Substituted phenalenones Antiprotozoal activities

#### ABSTRACT

A set of derivatives encompassing structural modifications on the privileged phenalenone scaffold were assessed for their antiparasitic activities against the most clinically relevant forms of trypanosomiasis and leishmaniasis. Several compounds exhibited leishmanicidal effects at levels comparable or better than the reference drug pentamidine, while the parent phenalenone was shown to have a level of activity against *Trypanosoma cruzi* comparable to the marketed drug benznidazole.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Trypanosomatids of the order Kinetoplastida are the causative agents of several lethal parasitic diseases, such as Chagas' disease (Trypanosoma cruzi), and African sleeping sickness (Trypanosoma brucei). The human protozoan parasite Leishmania is the causative agent of leishmaniasis, a disease with a wide variety of clinical manifestations, ranging from self-healing cutaneous lesions (mostly from Leishmania tropica and Leishmania mexicana complexes) to life-threatening visceral infections caused by different species of the donovani complex (Leishmania donovani, Leishmania infantum, and Leishmania chagasi). The reemergence of trypanosomiasis and leishmaniasis over the last two decades has become a significant threat to human health and the economical development of several developing nations. The drugs which have been most frequently used to treat the leishmaniasis (the pentavalent antimonials, Pentostam, and Glucantime<sup>1</sup>) are however, quite toxic and in some areas resistance can be as high as  $40\%^{2,3}$  Likewise those used for trypanosomiasis, such as Nifurtimox (currently discontinued) and Benznidazole are still inadequate due to their undesired side effects.<sup>4</sup> Indeed, no vaccine or recommended drugs are currently available to prevent these diseases. Moreover, once the infection has progressed into its later stages none of the marketed drugs are effective. The emergence of drug-resistant parasites is also becoming an additional and major problem. Further investigations are therefore urgently needed to discover new drugs that are not only effective, but also affordable and readily available for the treatment of these infectious diseases.

Previous work from our group had demonstrated that a set of antifungal phytoalexins, <sup>5,6</sup> based on a phenyl-phenalenone skeleton, possessed leishmanicidal activity.<sup>7</sup> In order to further investigate the effect of electronic and spatial changes on antiprotozoal activity we have synthesized a series of core modified structures, <sup>8-11</sup> as well as a set of new heteroaryl substituted phenalenones. Herein, we report their synthesis and their antiprotozoal activity against two forms of Leishmania (*Leishmania amazonensis*, *L. donovani*) and one form of Trypanosoma (*T. cruzi*).

#### 2. Results and discussion

#### 2.1. Synthesis

The heteroaryl-substituted phenalenones were prepared using a general two step Michael addition-oxidation sequence. The required heteroaryl Grignards for the preparation of compounds **6**, **7**, and **10** were generated in situ via either direct lithiation and metal exchange, or lithium-halogen exchange followed by metal exchange as shown in Table 1 (entries 1–3).

<sup>\*</sup> Corresponding authors. Tel.: +34 922 318575; fax: +34 922 318571. *E-mail address*: tereabad@ull.es (T. Abad-Grillo).

<sup>0968-0896/\$ -</sup> see front matter 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.bmc.2010.04.062

#### Cytotoxic Triterpenoids from Maytenus retusa

Sandra M. Oramas-Royo,<sup>†,‡</sup> Haydee Chávez,<sup>§</sup> Patricia Martín-Rodríguez,<sup>⊥,‡</sup> Leandro Fernández-Pérez,<sup>⊥,‡</sup> Ángel G. Ravelo,<sup>\*,†,‡</sup> and Ana Estévez-Braun<sup>\*,†,‡</sup>

Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Avenida Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206, La Laguna, Tenerife, Spain, Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC), Facultad de Farmacia, Universidad de San Luis Gonzaga de Ica, Perú, and Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain

#### Received July 28, 2010

Seven new triterpenoids (1–7) and 36 known compounds were isolated from the root bark of *Maytenus retusa*. Their structures were determined by 1D and 2D spectroscopic studies. Several compounds were evaluated for their cytotoxicity against the human tumor cell lines HL-60 and MCF-7. Some of them were cytotoxic, with IC<sub>50</sub> values ranging between 0.2 and 4.7  $\mu$ M.

The Celastraceae family, a group of dicotyledonous species consisting of about 1300 species in 106 genera, is widely distributed through the warm temperature regions of the world.<sup>1</sup> Celastraceae species have been used for centuries throughout South America and mainland China as insect repellents and insecticides and for the treatment of ailments ranging from stomach complaints to fever, rheumatoid arthritis, and cancer.<sup>2</sup>

Some examples are the peruvian species *Maytenus macrocarpa* and *Maytenus amazonica*,<sup>3</sup> which are used in the treatment for rheumatism, influenza, gastrointestinal diseases, and skin cancer, and *Maytenus ilicifolia*,<sup>4</sup> which is used as an analgesic, antilcerogenic, antiseptic, and antitumor agent.

*Maytenus* species constitute a rich source of terpenoids such as friedelane-type triterpenes (quinonemethide, enequinone-methide, and phenolic types),<sup>5–7</sup> lupanes,<sup>8</sup> oleananes,<sup>9,10</sup> dimeric triterpenes,<sup>11–13</sup> diterpenes such as kaurane and abietane, <sup>14–16</sup> sesquiterpenes,<sup>17</sup> and sesquiterpene-triterpene hetero-Diels–Alder adducts.<sup>18</sup>

The aromatic and quinoid triterpenes are of interest due to their antibiotic and cytotoxic activities.<sup>19</sup> Given that metabolites present in *Maytenus* species possess interesting biological activities and the absence of any previous phytochemical studies on *Maytenus retusa* (Poiret) Briq (Celastraceae), we examined this species. In this paper we describe the isolation and structural elucidation of seven new terpenes (1–7) and 36 known terpenoids. The structures of the isolated compounds were determined by spectroscopic studies (<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR), including bidimensional homonuclear (COSY and ROESY) and heteronuclear (HSQC and HMBC) correlation experiments. Some of the compounds showed cytotoxic activity against the human tumor cell lines HL-60 and MCF-7.

#### **Results and Discussion**

Repeated chromatography of a CHCl<sub>3</sub> extract of the root bark of *M. retusa* on silica gel and Sephadex LH-20 yielded seven new compounds (1-7) and 36 known terpenes:  $\alpha$ -cyperotundone (8),<sup>20</sup> mayteine (9),<sup>21</sup> lupeol (10),<sup>22</sup> nepeticin (11),<sup>23</sup> calenduladiol (12),<sup>24</sup> resinone (13),<sup>25</sup> 3-oxo-friedel-1-ene (14),<sup>26</sup> 3 $\beta$ -hydroxyolean-9(11): 12-diene (15),<sup>27</sup> 3 $\beta$ -hydroxyurs-9(11):12-diene (16),<sup>26</sup> 3 $\beta$ ,29-di-hydroxytingenone (20),<sup>31</sup> 20 $\beta$ -hydroxytingenone (21),<sup>32</sup> 22 $\beta$ -hydroxytingenone (22),<sup>33</sup> pristimerine (23),<sup>34</sup> dispermoquinone (24),<sup>35</sup> amazoquinone (25),<sup>36</sup> 6-oxotingenol (26),<sup>37</sup> 3-O-methyl-6-



oxotingenol (**27**),<sup>37</sup> 3-*O*-methyl-23-hydroxy-6-oxotingenol (**28**),<sup>38</sup> 22β-hydroxy-6-oxotingenol (**29**),<sup>39</sup> 6-oxopristimerol (**30**),<sup>37</sup> 7-hydroxy-6-oxopristimerol (**31**),<sup>40</sup> 7,8-dihydro-6-oxoingenol (**32**),<sup>36</sup> 22β-hydroxy-7,8-dihydro-6-oxotingenol (**33**),<sup>39</sup> macrocarpin A (**34**),<sup>41</sup> blepharodol (**35**),<sup>5</sup> 7-oxo-blepharodol (**36**),<sup>42</sup> cheilocline A (**37**),<sup>18</sup> cheilocline B (**38**),<sup>18</sup> cheilocline C (**39**),<sup>18</sup> cheilocline D (**40**),<sup>18</sup> cheilocline F (**41**),<sup>18</sup> cheilocline I (**42**),<sup>18</sup> and milicifoline B (**43**),<sup>43</sup> (for structures of compounds **8**–**43**, see Figure S1 in the Supporting Information).

Compound **1** had the molecular formula  $C_{39}H_{56}O_4$  as determined by HREIMS. The IR spectrum showed absorption bands for OH (3394 cm<sup>-1</sup>) and carbonyl (1684 cm<sup>-1</sup>) groups. Preliminary

10.1021/np100517u © 2010 American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy Published on Web 11/23/2010

<sup>\*</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 922318576. Fax: +34 922318571. E-mail: aestebra@ull.es; agravelo@ull.es.

<sup>&</sup>lt;sup>†</sup> Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González".

<sup>\*</sup> Instituto Canario de Investigación del Cancer.

<sup>§</sup> Facultad de Farmacia, Universidad de San Luis Gonzaga de Ica.

<sup>&</sup>lt;sup>⊥</sup> Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.