

**MITOFLAVOSCINAS: LA FIJACIÓN COMO OBJETIVO DE ENZIMAS QUE
CONTIENEN FLAVINA ELIMINA CÉLULAS MADRE CANCEROSAS (CSCS)
AL INHIBIR LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL**

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente descripción se refiere a "mitoflavoscinas", compuestos que se enlazan a enzimas que contienen flavina e inhiben la función mitocondrial, e incluye métodos para sintetizar mitoflavoscinas, métodos para usar mitoflavoscinas para fijar como objetivo células madre cancerosas, y compuestos farmacéuticos tanto para tratar el cáncer como para reducir la resistencia a fármacos en células cancerosas, las composiciones farmacéuticas contienen una o más mitoflavoscinas como el ingrediente activo. También se dan a conocer "mitoflavinas" - compuestos que son derivados de riboflavina que inhiben la función mitocondrial.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los investigadores han batallado para desarrollar nuevos tratamientos anticancerosos. Las terapias convencionales contra el cáncer (por ejemplo irradiación, agentes alquilantes tal como ciclofosfamida y anti-metabolitos tal como 5-fluorouracilo) han intentado detectar y erradicar selectivamente células cancerosas que

25

crecen rápidamente al interferir con los mecanismos celulares involucrados en el crecimiento celular y la replicación del ADN. Otras terapias contra el cáncer han usado inmunoterapias que enlazan selectivamente antígenos tumorales mutantes en células cancerosas que crecen rápidamente (por ejemplo, anticuerpos monoclonales). Desafortunadamente, los tumores reaparecen frecuentemente después de esas terapias en el(los) mismo(s) o diferente(s) sitio(s), lo que indica que no todas las células cancerosas han sido erradicadas. La recaída puede ser debido a una dosificación quimioterapéutica insuficiente y/o la aparición de clones cancerosos resistentes a la terapia. Por lo tanto, se necesitan nuevas estrategias de tratamiento contra el cáncer.

Los avances en el análisis mutacional han permitido un estudio profundo de las mutaciones genéticas que ocurren durante el desarrollo del cáncer. A pesar de tener conocimiento del panorama genómico, la oncología moderna ha tenido dificultad con la identificación de mutaciones conductoras primarias a través de subtipos de cáncer. La dura realidad parece ser que cada tumor del paciente es único, y un tumor individual puede contener múltiples células clonales divergentes. Lo que se necesita, entonces, es un nuevo planteamiento que enfatice las similitudes entre diferentes tipos de cáncer. La fijación

como objetivo de las diferencias metabólicas entre células tumorales y normales es prometedora como una nueva estrategia de tratamiento contra el cáncer. Un análisis de datos de perfiles transcripcionales de muestras de cáncer de mama humano reveló más de 95 transcripciones de ARNm elevadas que estaban asociadas con la biogénesis mitocondrial y/o traducción mitocondrial. Sotgia y colaboradores, *Cell Cycle*, 11(23):4390-4401 (2012). Adicionalmente, más de 35 de los 95 ARNm regulados por incremento codifican proteínas ribosómicas mitocondriales (MRPs, por sus siglas en inglés). El análisis proteómico de células madre de cáncer de mama humano reveló del mismo modo la sobreexpresión significativa de varias proteínas mitorribosómicas, así como también otras proteínas asociadas con la biogénesis mitocondrial. Lamb y colaboradores, *Oncotarget*, 5(22):11029-11037 (2014).

La inhibición funcional de la biogénesis mitocondrial usando los efectos no acertados de ciertos antibióticos bacteriostáticos o inhibidores de OXPHOS proporciona evidencia adicional de que las mitocondrias funcionales se requieren para la propagación de células madre cancerosas. Los inventores mostraron recientemente que un tinte fluorescente mitocondrial (MitoTracker^{MR}) podría usarse de manera efectiva para el enriquecimiento y purificación de células de tipo madre cancerosas (CSCs, por

sus siglas en inglés) de una población heterogénea de células vivas. Farnie y colaboradores, *Oncotarget*, 6:30272-30486 (2015). Las células cancerosas con la masa mitocondrial más alta tuvieron la capacidad funcional más fuerte para experimentar un crecimiento independiente del anclaje, una característica asociada normalmente con el potencial metastático. La sub-población de células "Mito-high" también tuvo la actividad iniciadora de tumores más alta in vivo, como se mostró usando modelos pre-clínicos.

10

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

En vista de los antecedentes citados, los inventores se enfocaron en una búsqueda de nuevos inhibidores metabólicos de mitocondrias mediante el examen de una gran colección o biblioteca de fármacos aprobados por la FDA y otros compuestos de prueba relacionados con objetivos conocidos y mecanismos de acción establecidos. Los inventores limitaron la búsqueda a compuestos que reduzcan significativamente la producción de ATP mitocondrial, pero no incluyen la muerte celular (para evitar fármacos con efectos colaterales tóxicos agudos). Un objetivo de esta descripción es identificar presentes métodos para identificar mitoflavoscinas, compuestos que se enlazan a enzimas que contienen flavina e inhiben la producción de ATP mitocondrial. Un objetivo de esta

descripción también es identificar mitoflavoscinas que tienen propiedades anticancerosas y antibióticas. Un objetivo de esta descripción también es identificar mitoflavoscinas que tienen propiedades anti-envejecimiento.

5 Un objetivo de esta descripción también es identificar mitoflavoscinas que funcionan como radiosensibilizadores y fotosensibilizadores. El término "mitoflavoscinas" se refiere ampliamente a compuestos que se enlazan a enzimas que contienen flavina e inhiben funciones mitocondriales.

10 Por lo tanto, estos compuestos se pueden diseñar para fijar como objetivo y suprimir FMN, FAD y/o riboflavina. La presente descripción se refiere además a métodos para identificar mitoflavoscinas, métodos para hacer estas mitoflavoscinas y métodos para usar mitoflavoscinas para

15 fines terapéuticos.

Adicionalmente, los datos generados previamente sugieren que los inhibidores de la función mitocondrial que fijan como objetivo el ribosoma mitocondrial, referidos como "mitorriboscinas", se pueden usar para fijar como

20 objetivo bacterias y levadura patógenas, para proporcionar beneficios anti-envejecimiento, para funcionar como radiosensibilizadores y/o fotosensibilizadores, para sensibilizar células cancerosas a granel y células madre cancerosas a agentes quimioterapéuticos, productos

25 farmacéuticos y/u otras sustancias naturales, tales como

suplementos dietéticos y restricción calórica. Dadas sus propiedades de inhibición mitocondrial, las mitoflavoscinas se pueden usar similarmente para fijar como objetivo bacterias y levadura patógena, para proporcionar beneficios anti-envejecimiento, para funcionar como radiosensibilizadores y/o fotosensibilizadores, para sensibilizar células cancerosas a granel y células madre cancerosas a agentes quimioterapéuticos, productos farmacéuticos y/u otras sustancias naturales.

Las mitoflavoscinas se pueden identificar a través de un planteamiento convergente de examen de alto rendimiento seguido por la validación in vitro para la inhibición mitocondrial. Las mitoflavoscinas se pueden desarrollar rápidamente al combinar el diseño de fármacos in silico con el examen fenotípico de fármacos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIGURA 1 muestra un diagrama esquemático que resume una estrategia de desarrollo de fármacos de acuerdo con modalidades del presente planteamiento.

La FIGURA 2 muestra los efectos de cloruro de difenilenyodonio (DPI) sobre los niveles de ATP.

La FIGURA 3A muestra los efectos del DPI sobre la viabilidad celular de células MCF7. La FIGURA 3B muestra los efectos del DPI sobre la viabilidad celular de células

hTERT-BJ1.

La FIGURA 4A muestra los efectos del tratamiento durante 24 horas con DPI sobre la tasa de consumo de oxígeno (OCR, por sus siglas en inglés). La FIGURA 4B muestra los efectos de DPI sobre la respiración basal, fuga de protones, respiración vinculada con ATP, respiración máxima y capacidad respiratoria de reserva.

La FIGURA 5A muestra los efectos del tratamiento durante 24 horas con DPI sobre la tasa de acidificación extracelular (ECAR, por sus siglas en inglés). La FIGURA 5B muestra los efectos del DPI sobre la glucólisis, reserva glicolítica, ECAR no derivada de glucosa y capacidad de reserva glicolítica.

La FIGURA 6 muestra los efectos del DPI sobre la producción de L-lactato.

La FIGURA 7 muestra los efectos del DPI sobre la formación de mamíferas.

Las FIGURAS 8A y 8B muestran los efectos del DPI sobre el marcador de células madre cancerosas CD44+/CD24-.

La FIGURA 9 muestra los efectos del DPI sobre la producción mitocondrial de especies de oxígeno reactivo (ROS, por sus siglas en inglés).

La FIGURA 10 muestra los efectos del tratamiento durante una hora con DPI sobre OCR.

La FIGURA 11 muestra los efectos del tratamiento

durante una hora con DPI sobre ECAR.

Las FIGURAS 12A-12C muestran los efectos del tratamiento con DPI, "deslave" y recuperación sobre OCR.

La FIGURA 13 muestra los efectos del tratamiento
5 con DPI, "deslave" y recuperación sobre la respiración basal, fuga de protones, respiración vinculada con ATP, respiración máxima y capacidad respiratoria de reserva.

La FIGURA 14A muestra los efectos del tratamiento a largo plazo con DPI sobre OCR. La FIGURA 14B muestran los
10 efectos del tratamiento a largo plazo con DPI sobre la morfología y la densidad de células MCF7.

La FIGURA 15 muestra una comparación de la estructura del compuesto A, DPI y compuesto B, mononucleótido de flavina (FMN).

15 La FIGURA 16 compara la estructura del compuesto A, DPI y el compuesto relacionado B, cloruro de difenilyodonio.

La FIGURA 17 muestra las posibles ubicaciones para la unión de los grupos R funcionales que se pueden
20 agregar a DPI y compuestos relacionados con el DPI para fijar como objetivo las mitocondrias.

La FIGURA 18 muestra ejemplos de compuestos de mitoflavina, derivados de riboflavina que inhiben la función mitocondrial.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La siguiente descripción ilustra modalidades del presente planteamiento en detalle suficiente para hacer posible la práctica del presente planteamiento. Aunque el presente planteamiento se describe con referencia a esas modalidades específicas, se debe apreciar que el presente planteamiento se puede incorporar en diferentes formas, y no se debe interpretar que esta descripción limite alguna de las reivindicaciones anexas a las modalidades específicas que se exponen en este documento. Preferiblemente, estas modalidades se proporcionan de modo que esta descripción será exhaustiva y completa, y transmitirá completamente el alcance del presente planteamiento a aquellas personas expertas en el campo.

El metabolismo mitocondrial es una puerta de entrada sin explotar para el tratamiento de una variedad de afecciones, que varían desde cáncer a infecciones bacterianas y fúngicas hasta el envejecimiento. Se requieren mitocondrias funcionales para la propagación de células madre cancerosas. La inhibición del metabolismo mitocondrial en células cancerosas impide la propagación de esas células. El presente planteamiento exploró esta puerta de entrada al examinar una colección grande de fármacos aprobados por la FDA y otros compuestos de prueba relacionados, con objetivos conocidos y mecanismos de

acción establecidos, y restringió adicionalmente la búsqueda a compuestos que redujeran significativamente la producción de ATP, pero que no indujeron la muerte celular, para evitar fármacos con efectos colaterales tóxicos agudos.

Los inhibidores novedosos de la producción de ATP mitocondrial que se enlazan a enzimas que contienen flavina - mitoflavoscinas, se pueden identificar a través de un planteamiento que combina el examen fenotípico de fármacos y la validación funcional. La FIGURA 1 es una visión general de métodos para identificar mitoflavoscinas mediante el uso del examen fenotípico de fármacos y la validación funcional dados a conocer en este documento. Las modalidades del método pueden implicar el examen fenotípico de fármacos S101 y la validación funcional S102, y a partir de los resultados que seleccionan de uno o más fármacos candidatos S103. El examen fenotípico de fármacos S101 se puede conducir usando ensayos de agotamiento de ATP. Los ensayos de agotamiento de ATP pueden identificar compuestos los cuales pueden inducir funcionalmente el agotamiento de ATP sin inducir la muerte celular, para evitar en consecuencia efectos colaterales tóxicos. El ensayo de examen se puede realizar a través de una colección de moléculas. Por ejemplo, durante el desarrollo inicial de los inventores, las células MCF7 (6,000 células/pocillo) se

colocaron en placas de 96 pocillos negras de fondo claro y se incubaron durante toda la noche antes del tratamiento. Después, un subconjunto del conjunto de Compuestos Tocriscreen^{MR} (560 compuestos) se sujetó al examen
5 fenotípico de fármacos a una concentración de 20 μ M (Bio-Techne Corp, MN, EUA). Los compuestos se sometieron a prueba después de 72 horas de incubación y los experimentos se realizaron por triplicado. Después del tratamiento, los medios se aspiraron de los pocillos y las placas se lavaron
10 con PBS caliente (suplementado con/ Ca^{2+} y Mg^{2+}). Luego, las células se incubaron con una solución de tinción Hoechst 33342^{MR} (Sigma) (10 μ g/ml) durante 30 minutos y se lavaron con PBS. La fluorescencia se leyó con un lector de placas usando longitudes de onda de excitación/emisión a 355/460
15 nm. Luego, el ensayo luminiscente CellTiter-Glo^{MR} (Promega) se realizó para medir la actividad metabólica (contenido de ATP) en los mismos pocillos que se trataron con un compuesto determinado. Los ensayos se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las intensidades de
20 fluorescencia (tinción de Hoechst) y luminiscencia (contenido de ATP) se normalizaron con controles tratados con vehículo solo y se exhibieron como porcentajes. Los aciertos positivos se examinaron de nuevo a una concentración más baja (10 μ M) para identificar compuestos
25 que indujeron potencialmente el agotamiento de ATP. Se debe

apreciar que aquellas personas expertas en el campo pueden elegir emplear ensayos de agotamiento de ATP iguales o similares, modificar estos ensayos o pueden reemplazar el ensayo de agotamiento de ATP por otra metodología para
5 examinar compuestos seleccionados para la inhibición mitocondrial (por ejemplo, ensayos de consumo de oxígeno).

El DPI (cloruro de difenilenyodonio) se identificó como un potente inductor del agotamiento de ATP. Los inventores plantearon la hipótesis de que el DPI induce
10 el agotamiento de ATP en concentraciones aún más bajas. Los inventores trataron células cancerosas de mama humanas (MCF7) con concentraciones variantes de DPI durante 72 horas. Luego, las células se sujetaron a la tinción de ADN Hoechst fluorescente para normalizar el número de células.
15 Al emplear CellTiter-Glo^{MR} como sonda, los inventores pudieron usar la luminiscencia para medir el contenido de ATP en los mismos pocillos. En 72 horas de tratamiento, el DPI 500 nM redujo los niveles de ATP por >80%, pero no indujo significativamente ninguna muerte celular, ya que el
20 número de células unidas a la placa permaneció sin cambios (como se detectó por el contenido de ADN). La FIGURA 2 resume estos resultados y demuestra que el DPI agota selectivamente los niveles de ATP sin inducir la muerte celular masiva.

25 El presente planteamiento incluye métodos para

confirmar la viabilidad celular. Las personas de experiencia en el campo pueden seleccionar uno o más métodos para confirmar la viabilidad celular que sean adecuados para la modalidad particular. Los inventores
5 usaron un ensayo de Sulforrodamina (SRB), el cual se basa en la medición del contenido de proteínas celulares. Después del tratamiento durante cinco días en placas de 96 pocillos, las células se fijaron con ácido tricloroacético al 10% (TCA) durante 1 hora en la habitación fría y se
10 secaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego, las células se incubaron con SRB durante 15 minutos, se lavaron dos veces con ácido acético al 1% y se secaron con aire durante por lo menos 1 hora. Finalmente, el tinte enlazado a las proteínas se disolvió en una solución de
15 Tris 10 mM, pH 8.8 y se leyó usando el lector de placas a 540 nm. La FIGURA 3A muestra los efectos del DPI sobre la viabilidad celular de las células MCF7. En particular, los datos muestran que el DPI no afecta significativamente la viabilidad celular, incluso después de cinco días de
20 tratamiento. El DPI mostró poco o nada de toxicidad en células MCF7, a una concentración tan alta como 33 nM. La FIGURA 3B muestra los efectos del DPI sobre la viabilidad celular de células hTERT-BJ1. También se obtuvieron resultados virtualmente idénticos con fibroblastos normales
25 (hTERT-BJ1), los cuales mostraron poco o ningún efecto

tóxico, hasta 100 nM, después de cinco días de incubación (FIGURA 3B).

El presente planteamiento implica además métodos de validación funcional S102, durante los cuales se puede
5 confirmar la función de un compuesto como un inhibidor mitocondrial. Se puede usar una variedad de métodos para la validación funcional, que incluyen, por ejemplo, análisis de flujo metabólico, ensayos de mamíferos, ensayos de viabilidad y actividad antibiótica (anti-bacteriana y/o
10 anti-fúngica). Los inventores determinaron las tasas de consumo de oxígeno (OCR) y las tasas de acidificación extracelular (ECAR) en tiempo real en células MCF7 usando el analizador de Flujo Extracelular Seahorse^{MR} (XF96) (Seahorse Bioscience, MA, EUA). En resumen, las células
15 MCF7 se mantuvieron en DMEM suplementado con FBS al 10% (suero bovino fetal), GlutaMAX^{MR} 2 mM y Pen-Estrep al 1%. Se sembraron 8,000 células por pocillo en placas de cultivo de células de 96 pocillos XF, y se incubaron durante toda la noche a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. Al
20 siguiente día, las células se lavaron con medios de ensayo XF pre-calentados (para la medición de OCR, los medios de ensayo XF se complementaron con glucosa 10 mM, piruvato 1 mM y se ajustaron a pH 7.4). Las células luego se mantuvieron en 175 µl/pocillo de medios de ensayo XF a
25 37°C, en una incubadora sin CO₂ durante 1 hora. Durante la

incubación, 25 uL de glucosa 80 mM, oligomicina 9 μ M, 2-desoxiglucosa 1 M (para la medición de ECAR) y 25 μ L de oligomicina 10 μ M, FCCP 9 μ M, rotenona 10 μ M, antimicina A 10 μ M (para la medición de OCR) en medios de ensayo XF se cargaron en los orificios de inyección del cartucho sensor XFe-96^{MR}. Durante el experimento, el instrumento inyectó estos inhibidores en los pocillos en un punto de tiempo determinado, mientras que la ECAR/OCR se midió continuamente. Las medidas de ECAR y OCR se normalizaron por el contenido de proteína (ensayo de Sulforrodamina B). Los conjuntos de datos se analizaron mediante el software XFe-96^{MR}, usando los cálculos ANOVA unidireccional y prueba t de Student. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Los resultados de OCR muestran que el DPI tuvo poco o ningún efecto a la concentración de 2.5 nM. Sin embargo, a 5 nM, la respiración basal se redujo por ~50%. Finalmente, a 10 nM, la tasa de respiración basal se disminuyó por ~85%, dando por resultado una reducción >90% en la producción de ATP. Las FIGURAS 4A-4B resumen estos resultados e ilustran que el DPI inhibe potencialmente la respiración mitocondrial. La FIGURA 4A muestra los efectos del tratamiento con DPI sobre la OCR a través del tiempo, y la FIGURA 4B muestra los efectos del tratamiento con DPI sobre la respiración basal, fuga de protones, respiración

vinculada con ATP, respiración máxima y capacidad respiratoria de reserva. Se debe apreciar que se conocen numerosos métodos para la validación funcional, y que las personas de experiencia en el campo pueden seleccionar uno
5 o más dependiendo de las necesidades de validación (por ejemplo, otros ensayos que miden o aproximan la función mitocondrial).

Como se mencionara anteriormente, para determinar si los efectos anti-mitocondriales del DPI inducen una
10 respuesta glicolítica reactiva, los inventores sujetaron células cancerosas de mama tratadas con DPI a una "prueba de estrés glicólico" al determinar la ECAR. Las células MCF7 se sujetaron al análisis de flujo metabólico con Seahorse XFe96^{MR}, el cual también mide la ECAR como un
15 marcador sustituto para la producción de L-lactato. Después de 24 horas de tratamiento con DPI (2.5 nM), se observó poco o ningún efecto. Sin embargo, con DPI 10 nM, la glicólisis se incrementó por ~2 veces. Las FIGURAS 5A-5B resaltan que el DPI indujo potentemente un fenotipo
20 glicolítico. La FIGURA 5A muestra los efectos del DPI sobre la ECAR a través del tiempo. La FIGURA 5B muestra los efectos del DPI sobre la glicólisis, la reserva glicolítica y la capacidad de reserva glicolítica.

Para confirmar que el incremento observado en
25 ECAR corresponde a la producción de L-lactato, los niveles

de L-lactato se midieron directamente usando el Analizador de Microdiálisis ISCUS^{flexMR} (M Dialysis Inc., MA, EUA). Los medios de cultivo se recolectaron, se centrifugaron y se analizaron con el Analizador de Microdiálisis ISCUS^{flexMR} después del tratamiento de células MCF7 con varias concentraciones de DPI durante 1, 3 o 5 días. La calibración del instrumento se realizó mediante muestras proporcionadas por el fabricante. Luego los niveles de L-lactato se midieron y se normalizaron con muestras tomadas de células MCF7 tratadas únicamente con vehículo. La FIGURA 6 muestra que el DPI indujo una producción significativa de L-lactato, casi duplicando la cantidad de lactato producido, consistente con un incremento de 2 veces en la glicólisis.

El presente planteamiento puede implicar, en algunas modalidades, métodos para someter a prueba compuestos por propiedades anticancerosas. Por ejemplo, los inventores examinaron la capacidad del DPI para inhibir la formación de mamíferas en células MCF7. Una suspensión celular individual de células MCF7 se preparó usando la desagregación enzimática (Trypsina-EDTA 1x, Sigma Aldrich) y manual (aguja calibre 25). Las células luego se colocaron a una densidad de 500 células/cm² en medio de mamíferas (DMEM-F12/B27/20 ng/ml de EGF/PenEstrep) en condiciones no adherentes, en discos de cultivo revestidos con (2-

hidroxietilmetacrilato) (poli-HEMA, Sigma). Las células se desarrollaron durante 5 días y se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37°C a una presión atmosférica en 5% de dióxido de carbono/aire (v/v). Después de 5 días en cultivo, las esferas >50 µm se contaron usando una retícula ocular, y el porcentaje de células plaqueadas que formaron esferas se calculó y es referido como porcentaje de formación de mamíferas, normalizado con controles tratados con vehículo solo. Los ensayos de mamíferas se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces independientemente. La FIGURA 7 resalta que el DPI inhibió de manera dependiente de la dosis la propagación de CSC en el ensayo de mamíferas. El tratamiento con DPI redujo significativamente la propagación de CSC, de una manera dependiente de la concentración, con un valor IC-50 de 3.23 nM. Se debe apreciar que aquellas personas expertas en el campo pueden usar otros métodos conocidos en el campo para evaluar los efectos de una mitoflavoscina candidata sobre una línea de células particular sin apartarse del presente planteamiento. También se debe apreciar que aquellas personas expertas en el campo pueden evaluar los efectos de una mitoflavoscina candidata sobre otros tipos de cáncer, ya que los inhibidores fijan como objetivo células madre cancerosas (CSCs). Las CSCs muestran cualidades conservadas o similares a través de la mayoría de los tipos de cáncer.

Para validar adicionalmente los descubrimientos, los inventores usaron un segundo planteamiento independiente para cuantificar la "estaminalidad" en células cancerosas. Los inventores examinaron marcadores
5 específicos de la superficie celular, específicamente sondas de anticuerpos fluorescentes dirigidas contra CD44 y CD24. La población de células CD44+/CD24- representa una fracción enriquecida con CSC. 1×10^5 células MCF7 se colocaron en placas de 6 pocillos en medios completos
10 suplementados con FBS inactivado con calor al 10%. Al siguiente día, las células se trataron con DPI (5, 10, 50 nM) durante 5 días. Las células de control con vehículo solo (DMSO) se procesaron en paralelo. En resumen, 30,000-50,000 células vivas, como se identificó por medio de la
15 tinción con 7-AAD, se analizaron por la expresión de CD24/CD44. Los inventores usaron anticuerpos para CD24 (CD24-PE IOTest, Beckman Coulter) y CD44 (CD44 Anti-Humano de ratón APC, BD Pharmingen) para el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS,
20 por sus siglas en inglés), usando el BD LSR Fortessa (BD Bioscience). Los resultados son el promedio de tres réplicas biológicas (repeticiones) y se expresan como porcentajes de la intensidad de fluorescencia media, normalizada con el control. El análisis ANOVA unilateral se
25 usó con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Las FIGURAS 8A y 8B muestran que el DPI elimina selectivamente estas CSCs de la población total de células. La población de células CD44+/CD24- se redujo de manera dependiente de la dosis mediante el tratamiento con DPI,
5 con un valor IC-50 de 10 nM. Se debe apreciar que se conocen otros métodos para cuantificar la estaminalidad en células cancerosas, y que las personas de experiencia en el campo pueden seleccionar uno o más dependiendo de las necesidades de validación.

10 Los inventores plantearon la hipótesis de que el posible mecanismo por medio del cual el DPI inhibe la propagación de CSC es mediante la inducción de la producción mitocondrial de especies de oxígeno reactivo (ROS). Para someter a prueba esta hipótesis, los inventores
15 determinaron los efectos del DPI sobre la producción mitocondrial de ROS, sobre el intervalo de 5 a 50 nM. En resumen, la producción de superóxido por mitocondrias se midió mediante el indicador de superóxido mitocondrial rojo MitoSOX^{MR} (ThermoFisher Sci., M36008). 3×10^5 células
20 MCF7/pocillo se colocaron en placas de 6 pocillos en medios completos suplementados con FBS inactivado con calor al 10%. Al siguiente día, las células se trataron con DPI (5, 50 nM) o Rotenona (0.5 μ M) durante 24 horas. El vehículo solo (DMSO) para células de control se procesó en paralelo.
25 Por lo menos 30,000 eventos fueron registrados por FACS

usando Fortessa (BD Bioscience). Tres réplicas biológicas (repeticiones) se analizaron en experimentos independientes. Los resultados son el promedio de la media de cada experimento y se expresan como porcentajes de intensidad de fluorescencia media normalizada con control. La FIGURA 9 muestra que, a una concentración de 5 nM, el DPI no indujo ninguna producción mitocondrial de ROS detectable, en relación con células de control, tratadas con vehículo solo. Sin embargo, el DPI 50 nM indujo la misma cantidad de ROS mitocondrial que Rotenona 500 nM, lo cual sirvió como control positivo. Por lo tanto, la misma concentración de DPI (5 nM) que inhibió la formación de mamíferas por >50% no incrementó la producción mitocondrial de ROS. Como tal, los efectos del DPI en dosis bajas sobre la "estaminalidad" en células cancerosas no pueden ser explicados simplemente por la producción de ROS.

Dada la alta potencia del DPI, los inventores evaluaron su capacidad para afectar rápidamente el metabolismo celular. La FIGURA 10 demuestra la acción rápida del DPI sobre la respiración mitocondrial. Después de tan solo una hora de tratamiento con DPI, la OCR mitocondrial se redujo progresivamente, sobre un intervalo de concentración de 10 a 100 nM. La respiración basal se inhibió con un valor IC-50 de 50 nM. Similarmente, el DPI indujo rápidamente un fenotipo glicolítico reactivo. La

glicólisis se incrementó progresivamente, sobre un intervalo de concentración de 5 a 100 nM. La FIGURA 11 muestra que la glicólisis se duplicó efectivamente.

Los efectos del DPI también pueden ser sumamente reversibles. Para evaluar la reversibilidad de los efectos del DPI, las células MCF7 se sujetaron primero al tratamiento con DPI durante 24 horas. Luego, el DPI se retiró ("deslave") y las células se cultivaron durante 24 horas adicionales, para permitir la recuperación. La FIGURA 12 muestra que con DPI 10 nM, hubo una recuperación casi completa de la respiración basal, que se aproxima a 100%, después de solo 24 horas (FIGURA 12C). Las concentraciones más altas mostraron recuperación significativa, aunque la recuperación no fue tan completa. Similarmente, la FIGURA 13 muestra la recuperación casi completa o completa para la respiración basal, fuga de protones, respiración vinculada con ATP y respiración máxima, para las poblaciones tratadas con DPI 10 nM y 10 nM después del "deslave".

Los inventores también examinaron los efectos del tratamiento a largo plazo con DPI en células. Las células MCF7 se cultivaron durante 1 mes en presencia de concentraciones variantes de DPI (10, 25 y 50 nM). Luego, se evaluó la respiración mitocondrial. La FIGURA 14A ilustra que todas esas concentraciones muestran una inhibición casi completa de la respiración. A una

concentración de DPI de 10 nM, la morfología y la densidad de las células permanecen sin cambios (FIGURA 14B).

Los inventores plantean la hipótesis de que el DPI bloquea la respiración mitocondrial al inhibir enzimas que contienen flavina (mononucleótido de flavina (FMN), dinucleótido de flavina y adenina (FAD) y riboflavina). Una comparación de las estructuras de (A) DPI y (B) FMN se muestra en la FIGURA 15. Las enzimas que contienen flavina incluyen tres componentes proteicos del Complejo mitocondrial I - NDUFV1 (51 kD), NDUFV2 (24 kD) y NDUFV3 (10 kD). SDHA es también una flavo-proteína que es parte de tanto el complejo mitocondrial II como el ciclo de Krebs. Mediante el uso de GeneCards^{MR} como herramienta de referencia bioinformática, los inventores calculan que ~70% de todos los productos de genes que contienen flavina están localizados en la mitocondria (Weizmann Institute of Science, Rehovot, IL). Como tal, los inventores plantean la hipótesis de que el DPI actúa al inhibir la mitocondria en los complejos I y II. Las acciones del DPI pueden ser a través de la inducción de una deficiencia mitocondrial en FMN y/o FAD, y/o al inactivar enzimas que contienen flavina en CSCs. Los inventores esperan por lo tanto que el DPI, análogos de DPI y compuestos relacionados con DPI (por ejemplo, cloruro de difenilyodonio), se puedan usar para tratar las CSCs (véase, por ejemplo, la FIGURA 17). Se debe

apreciar que los métodos dados a conocer en este documento se pueden usar para examinar y validar estos compuestos por la eficacia farmacéutica, que incluye por ejemplo, actividad anticancerosa, actividad anti-envejecimiento, actividad de radiosensibilización, actividad de fotosensibilización.

En algunas modalidades, las mitoflavoscinas se pueden diseñar para fijar como objetivo las mitocondrias mediante la unión de por lo menos una señal que fija como objetivo la membrana y/o por lo menos una señal que fija como objetivo las mitocondrias. Bajo el presente planteamiento, un compuesto se puede modificar con una señal de fijación como objetivo que incrementa la especificidad del compuesto hacia las mitocondrias. Por ejemplo, la FIGURA 18 muestra ubicaciones para la unión de grupos R funcionales que se pueden agregar al DPI o compuestos relacionados con el DPI para fijar como objetivo las mitocondrias. En algunas modalidades, la señal que fija como objetivo la membrana incluye ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico y ácido oleico. Se debe apreciar que ésta no es una lista exhaustiva de las señales que fijan como objetivo la membrana, y que una señal que fija como objetivo la membrana no listada se puede usar sin apartarse del presente planteamiento. En algunas modalidades, la señal

que fija como objetivo las mitocondrias incluye trifenilfosfonio (TPP), porciones basadas en guanidinio y ésteres de colina. Se debe apreciar que ésta no es una lista exhaustiva de señales que fijan como objetivo las mitocondrias, y que una señal que fija como objetivo las mitocondrias no listada se puede usar sin apartarse del presente planteamiento.

Se debe apreciar que los grupos R funcionales mostrados en la FIGURA 18 pueden ser los mismos o diferentes y se pueden seleccionar de cualquiera de: hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno, flúor, cloro, bromo, yodo, carboxilo, alcanos, alcanos cíclicos, derivados basados en alcanos, alquenos, alquenos cíclicos, derivados basados en alquenos, alquinos, derivados basados en alquinos, cetonas, derivados basados en cetonas, aldehídos, derivados basados en aldehídos, ácidos carboxílicos, derivados basados en ácidos carboxílicos, éteres, derivados basados en éteres, ésteres y derivados basados en ésteres, aminas, derivados basados en aminos, amidas, derivados basados en amidas, areno monocíclico o policíclico, heteroarenos, derivados basados en arenos, derivados basados en heteroarenos, fenoles, derivados basados en fenoles, ácido benzoico, derivados basados en ácido benzoico y una o más señales que fijan como objetivo las mitocondrias, entre otros grupos funcionales

identificados posteriormente. Como aclaración, las señales que fijan como objetivo las mitocondrias se definen como cualquier entidad química o peptídica que incremente la eficiencia de fijación como objetivo de la molécula unida a
5 las mitocondrias. Se esperaría que esta modificación incremente la potencia y efectividad de un compuesto. De esta manera, R puede ser cualquier señal que fija como objetivo las mitocondrias (péptido o químico), inclusive compuestos catiónicos, tales como tri-fenil-fosfonio (TPP),
10 una porción basada en guanidinio y/o ésteres de colina, entre otros.

Puesto que el DPI fija como objetivo enzimas que contienen flavina, sus efectos sobre la función mitocondrial pueden ser explicados por la inducción
15 farmacológica de una deficiencia de riboflavina aguda (Vitamina B2). La riboflavina es el precursor bioquímico de FAD y FMN. Los estudios previos han mostrado que, cuando las células HepG2 de mamífero se cultivaron en medios libres de riboflavina, los componentes claves del complejo
20 mitocondrial I (NDUFS1; NDUFV2) y el complejo mitocondrial II (SDHA) se redujeron significativamente (hasta 5 veces), al igual que muchas otras proteínas relacionadas con las mitocondrias, tales como AIFM1, DLD, MCAD y NQO1. Los datos previos también han mostrado que las flavinas son
25 marcadores auto-fluorescentes de la potencia mitocondrial

incrementada y la actividad de CSC elevada. De esta manera, el DPI, los análogos de DPI y los compuestos relacionados con DPI se pueden usar para tratar CSCs mediante la fijación como objetivo de flavinas.

5 Debido a que el DPI puede erradicar las CSCs a través de la inhibición de la respiración mitocondrial por vía de la inducción aguda y reversible de una deficiencia de flavina (probablemente FMN), los inventores plantean la hipótesis de que el(los) mecanismo(s) para inducir de
10 manera aguda una deficiencia de riboflavina también puede ser útil para erradicar terapéuticamente las CSCs. Otro método para inducir una deficiencia aguda de riboflavina puede ser usar derivados "dominantes negativos" de riboflavina. Estos derivados de riboflavina también se
15 podrían mejorar mediante la adición de grupos químicos para incrementar su potencia. Por ejemplo, la Roseoflavina [8-Dimetil-8-(dimetilamino)-riboflavina u 8-Dimetilaminorriboflavina] es un compuesto antibacteriano de origen natural que es un derivado de riboflavina, el cual
20 se puede modificar químicamente para optimizar su potencial para fijar como objetivo las CSCs. El Lumicromo (7,8-Dimetilaloxazina) es un fotoproducto fluorescente de la degradación de riboflavina, el cual también se puede modificar químicamente para optimizar su potencial para
25 fijar como objetivo las CSCs. Otros derivados comunes de

riboflavina incluyen: Aloxazina, Lumiflavina, 1,5-dihidrorriboflavina y 1,5-dihidroflavina. Estos derivados de riboflavina se pueden modificar para incrementar su eficiencia para fijar como objetivo las mitocondrias mediante la adición de una señal que fija como objetivo la membrana o una señal que fija como objetivo las mitocondrias, tales como i) una porción de ácido graso o ii) una porción de TPP (trifenil-fosfonio). Estas porciones que fijan como objetivo las mitocondrias se pueden denominar "mitoflavinas", compuestos que son derivados de riboflavina que inhiben la función mitocondrial. Los ejemplos de mitoflavinas se proporcionan en la FIGURA 18, en donde FA indica una porción de ácido graso y TPP indica una porción de trifenil-fosfonio.

Los inventores plantean la hipótesis de que un mecanismo adicional para los efectos del DPI sobre las mitocondrias es la inhibición de la producción de ROS (es decir, anión de superóxido), al prevenir el transporte inverso de electrones de succinato al complejo mitocondrial I, y sin afectar el transporte directo de electrones. El DPI previene la producción de una reacción colateral no deseada, la cual contribuye a la producción innecesaria de ROS y al daño celular, durante la respiración mitocondrial.

La evidencia adicional muestra que la fijación como objetivo del metabolismo de otras vitaminas se puede

usar como una estrategia de tratamiento contra el cáncer. Los anti-folatos son anti-metabolitos que bloquean o alteran las acciones de folato. La mayoría de los fármacos anti-folato ejercen sus efectos al fijar como objetivo la dihidrofolato reductasa (DHFR). El folato sirve como un co-factor para muchas enzimas biosintéticas (es decir, metiltransferasas) que impulsan la biosíntesis de metionina, serina, purina y timidina. Los ejemplos de fármacos anti-folato aprobados por la FDA incluyen:

Metotrexato; Pemetrexed; Proguanilo; Pirimetamina; y Trimetoprima. Las acciones de anti-folatos fijan como objetivo preferentemente células que se dividen rápidamente, en especial durante la síntesis de ADN (la fase S del ciclo celular). Actualmente, el Metotrexato y el Pemetrexed se usan rutinariamente para el tratamiento de varios tipos de cáncer, tales como osteosarcoma, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, mesotelioma y malignidades hematológicas. Por lo tanto, la terapia con anti-folatos se considera como una estrategia exitosa para tratar el cáncer y varias enfermedades parasitarias infecciosas, tales como malaria, toxoplasmosis y neumonía por *Pneumocystis*. Sin embargo, los anti-folatos también tienen efectos colaterales significativos, debido a que también afectan la proliferación de células normales, lo que conduce a náuseas, vómito, dolor abdominal, agranulocitosis y anemia

aplástica (supresión de la médula ósea). La fijación como objetivo de flavinas con DPI, análogos de DPI y compuestos relacionados con DPI (por ejemplo, cloruro de difenilyodonio) puede proporcionar resultados mejorados
5 sobre esos tratamientos actuales.

Las mitocondrias han sido implicadas directamente en el proceso de envejecimiento. Sin embargo, su papel exacto sigue siendo un tema debatido apasionadamente. Los inventores plantean la hipótesis de que el DPI se puede
10 usar para mantener las células normales en un estado de quiescencia metabólica o "animación suspendida", similar a la hibernación, lo cual podría ser extremadamente útil para desacelerar o revertir el proceso de envejecimiento. En apoyo de esta afirmación, los estudios previos en *C.*
15 *elegans* han mostrado que el DPI previene la acumulación de lipofuscina (un subproducto o marcador asociado con el envejecimiento), durante la respuesta al estrés oxidante.

La terminología usada en la descripción de la invención en este documento tiene como propósito describir
20 modalidades particulares únicamente y no se pretende que sea limitante de la invención. Como se usa en la descripción de la invención y las reivindicaciones anexas, se pretende que las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyan también las formas plurales, a menos que el
25 contexto indique claramente lo contrario. La invención

incluye numerosas alternativas, modificaciones y equivalentes como resultará evidente a partir de la consideración de la siguiente descripción detallada.

Se entenderá que, aunque los términos "primero",
5 "segundo", "tercero", "a)", "b)" y "c)", etcétera se pueden
usar en este documento para describir varios elementos de
la invención no deben ser limitados por esos términos.
Estos términos se usan únicamente para distinguir un
elemento de la invención de otro. De esta manera, un primer
10 elemento planteado posteriormente se podría denominar un
aspecto del elemento, y similarmente, un tercero sin
apartarse de las enseñanzas de la presente invención. De
esta manera, no se pretende que los términos "primero",
"segundo", "tercero", "a)", "b)" y "c)", etcétera,
15 transmitan necesariamente una secuencia u otra jerarquía a
los elementos asociados, sino se usan únicamente para fines
de identificación. La secuencia de operaciones (o pasos) no
está limitada a la otra presentada en las reivindicaciones.

A menos que se definan de otra manera, todos los
20 términos (inclusive términos técnicos y científicos) usados
en este documento tienen el mismo significado que es
entendido comúnmente por una persona de experiencia
ordinaria en el campo al cual pertenece esta invención. Se
entenderá además que términos, tales como aquellos
25 definidos en diccionarios usados comúnmente, se deben

interpretar como que tienen un significado que es consistente con su significado en el contexto de la presente solicitud y la técnica relevante y no se deben interpretar en un sentido idealizado o demasiado formal a menos que así se defina expresamente en este documento. La terminología usada en la descripción de la invención en este documento es con el propósito de describir únicamente modalidades particulares y no se pretende que sea limitante de la invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en este documento se incorporan a manera de referencia en su totalidad. En el caso de un conflicto en la terminología, la presente especificación prevalece.

También como se usa en este documento, "y/o" se refiere a y comprende cualquiera y la totalidad de posibles combinaciones de uno o más de los elementos listados asociados, así como también la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").

A menos que el contexto indique lo contrario, se pretende específicamente que las diversas cualidades de la invención descritas en este documento se puedan usar en cualquier combinación. Por otra parte, la presente invención también contempla que en algunas modalidades de la invención, cualquier cualidad o combinación de cualidades expuestas en este documento se puede excluir u

omitir. Para ilustrar, si la especificación establece que un complejo comprende los componentes A, B y C, se pretende específicamente que cualquiera de A, B o C, o una combinación de los mismos, se pueda omitir y desconocer.

5 Como se usa en este documento, la frase de transición "que consiste esencialmente de" (y variantes gramaticales) se debe interpretar como que comprende los materiales o pasos referidos "y aquellos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y
10 novedosa(s)" de la invención reclamada. De esta manera, el término "que consiste esencialmente de" como se usa en este documento no se debe interpretar como equivalente para "que comprende".

 Se pretende que el término "aproximadamente",
15 como se usa en este documento cuando se refiere a un valor medible, tal como, por ejemplo, una cantidad o concentración y similares, comprenda variaciones de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.5\%$, o incluso $\pm 0.1\%$ de la cantidad especificada. Un intervalo proporcionado en este documento
20 para un valor medible puede incluir cualquier otro intervalo y/o valor individual en el mismo.

 Habiendo descrito de esta manera ciertas modalidades de la presente invención, se debe entender que la invención definida por las reivindicaciones anexas no
25 debe ser limitada por detalles particulares expuestos en la

descripción anterior ya que muchas variaciones aparentes de la misma son posibles sin apartarse del espíritu o alcance de la misma como se reclama a continuación.

5

10

15

20

25

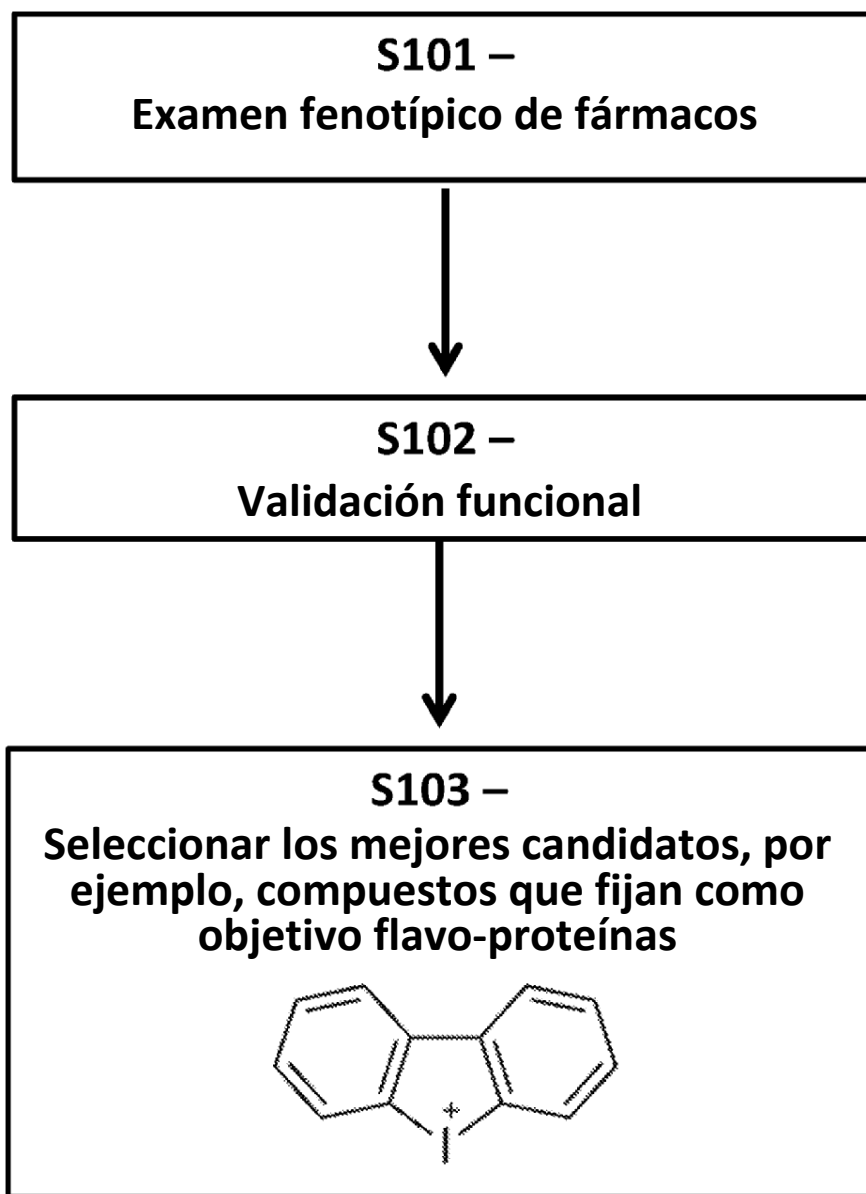
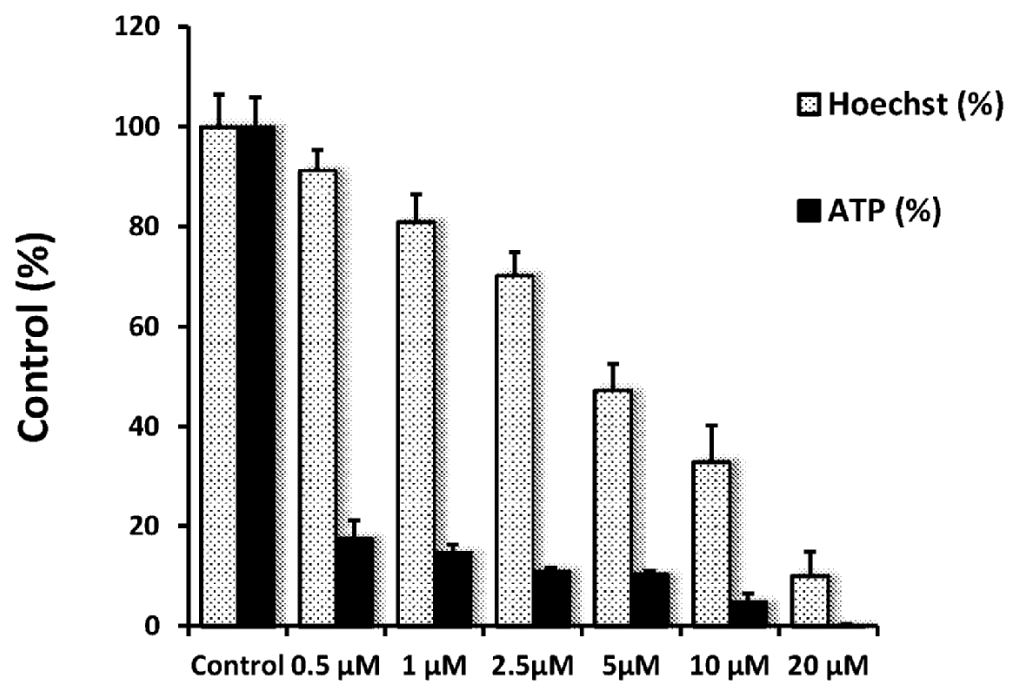


Figura 1

**Figura 2**

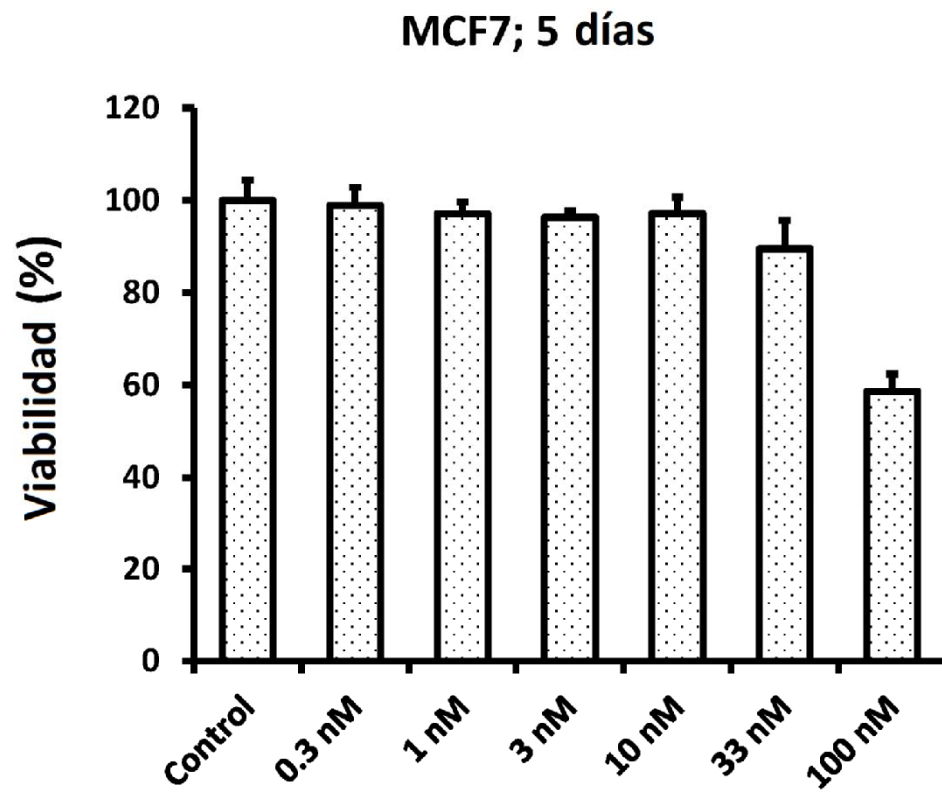
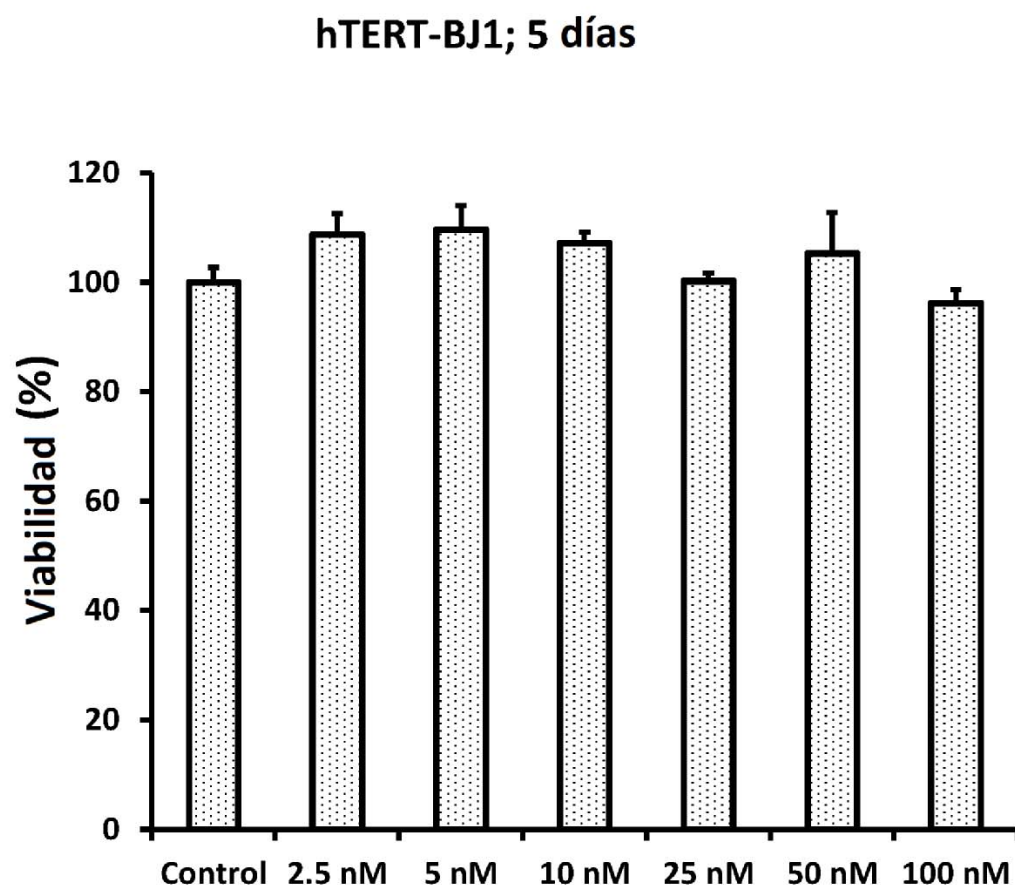
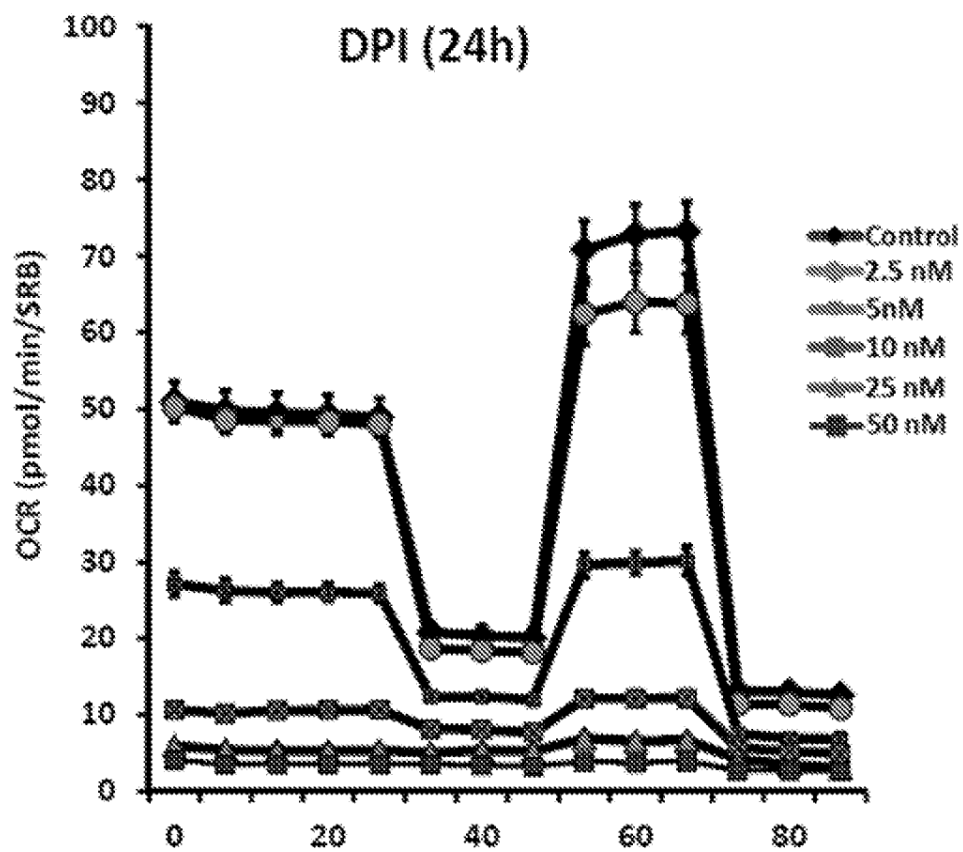


Figura 3A

**Figura 3B**

**Figura 4A**

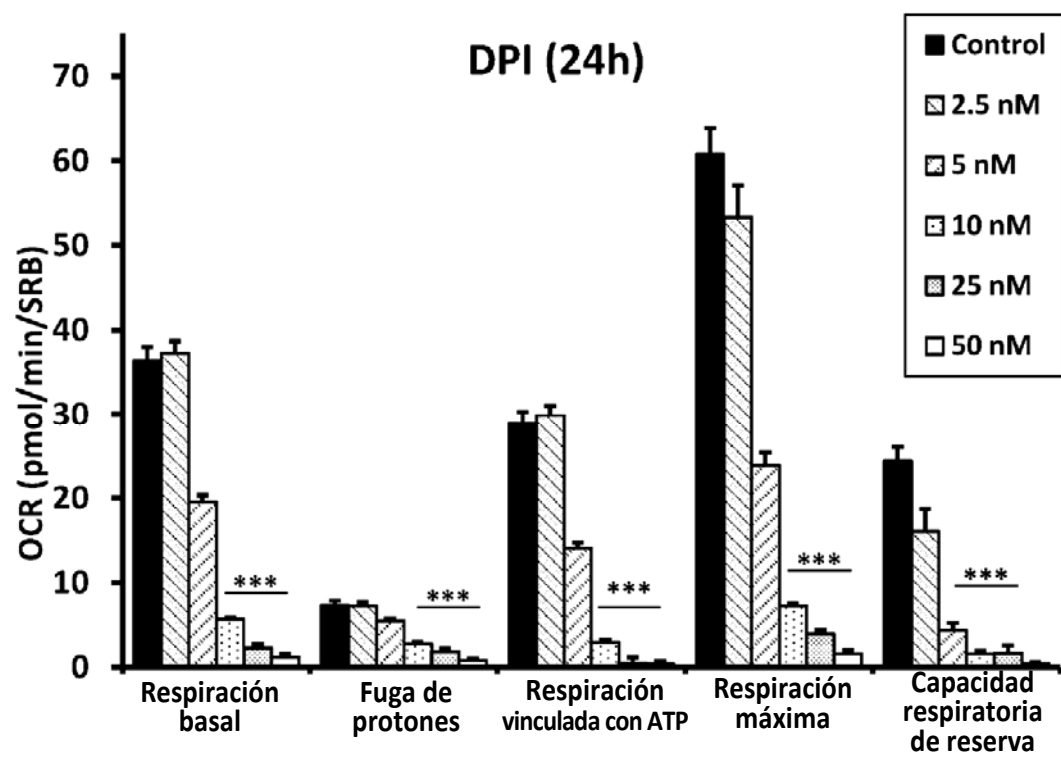
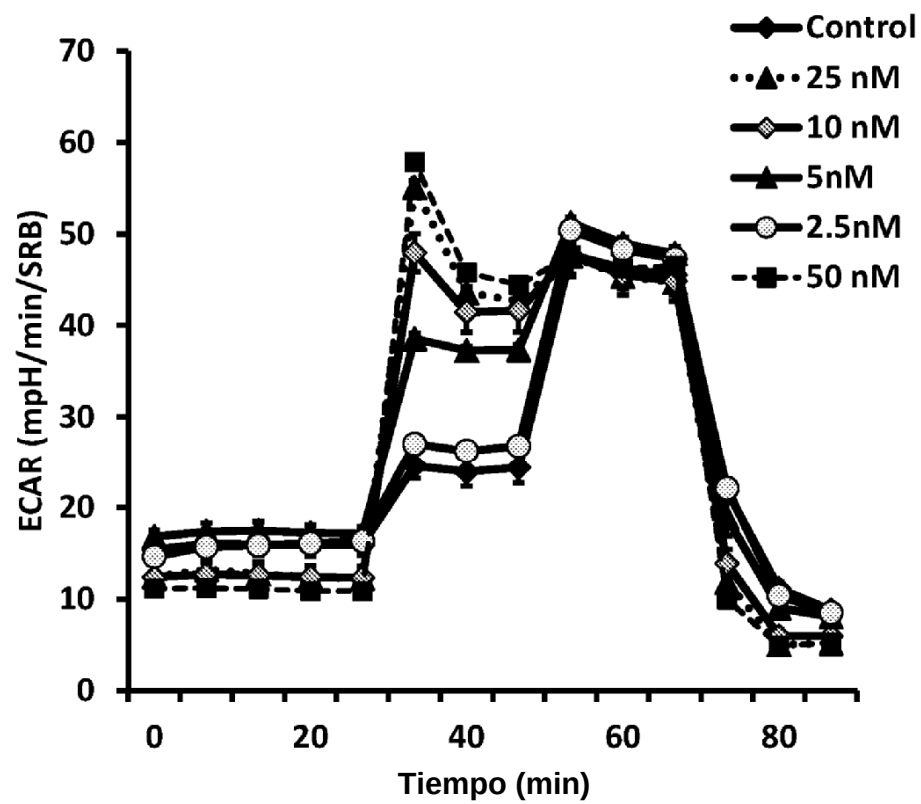


Figura 4B

**Figura 5A**

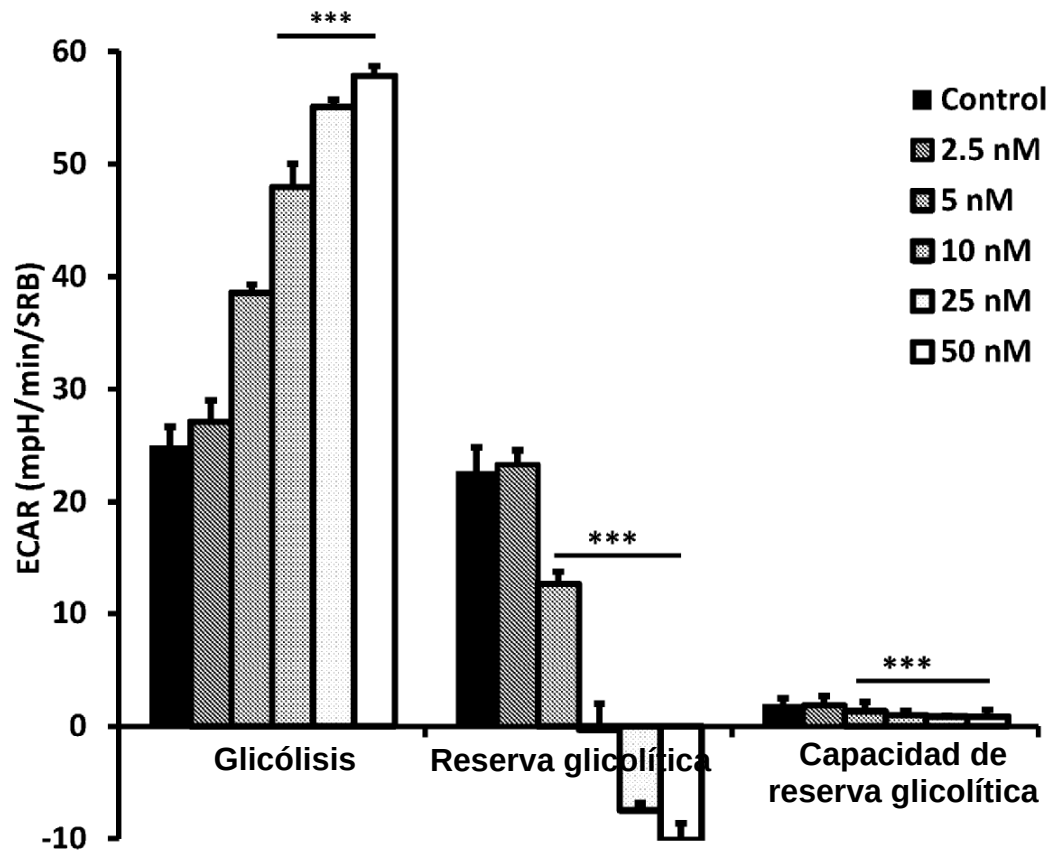


Figura 5B

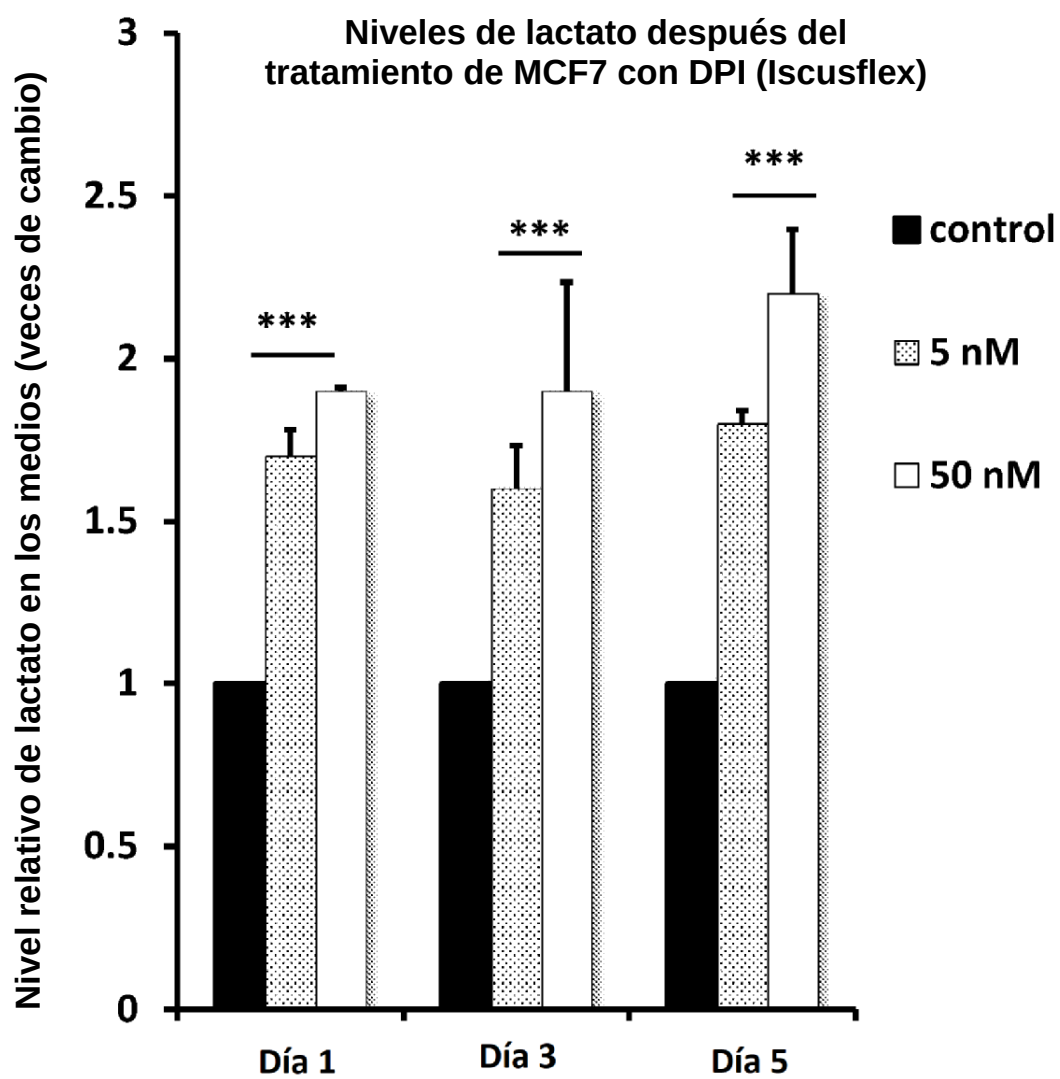
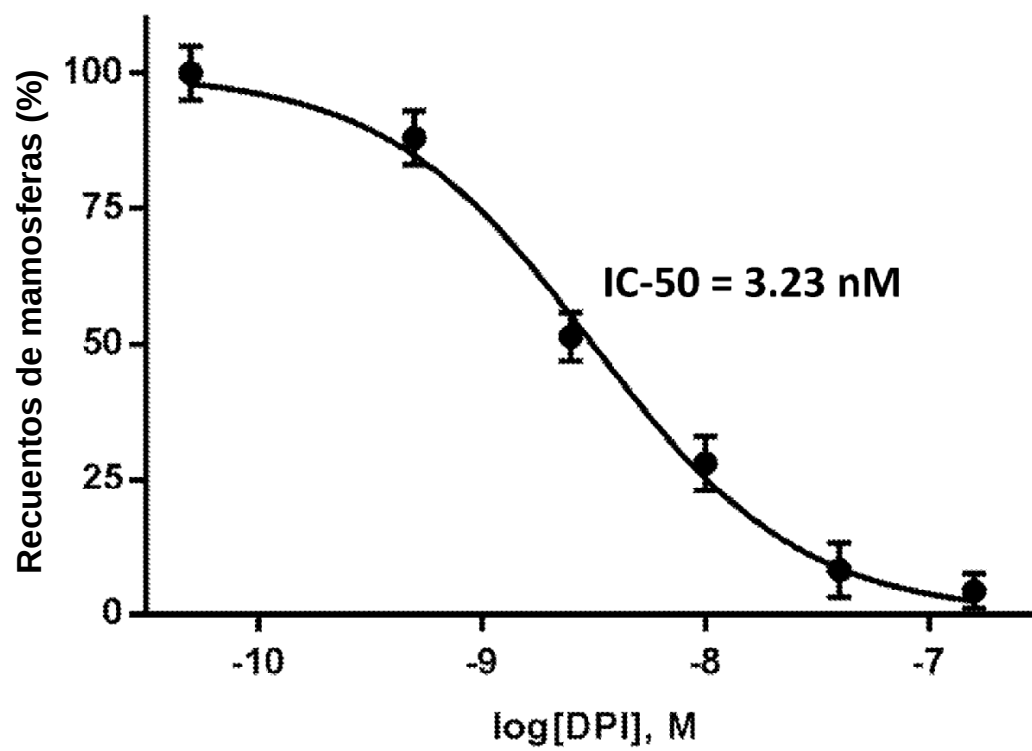
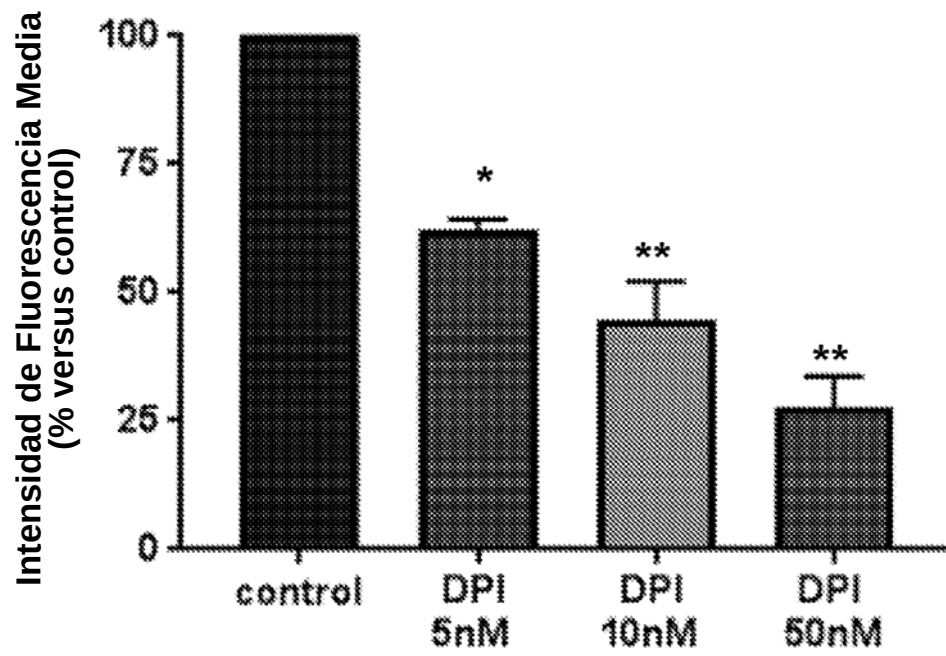


Figura 6

**Figura 7**

**Figura 8A**

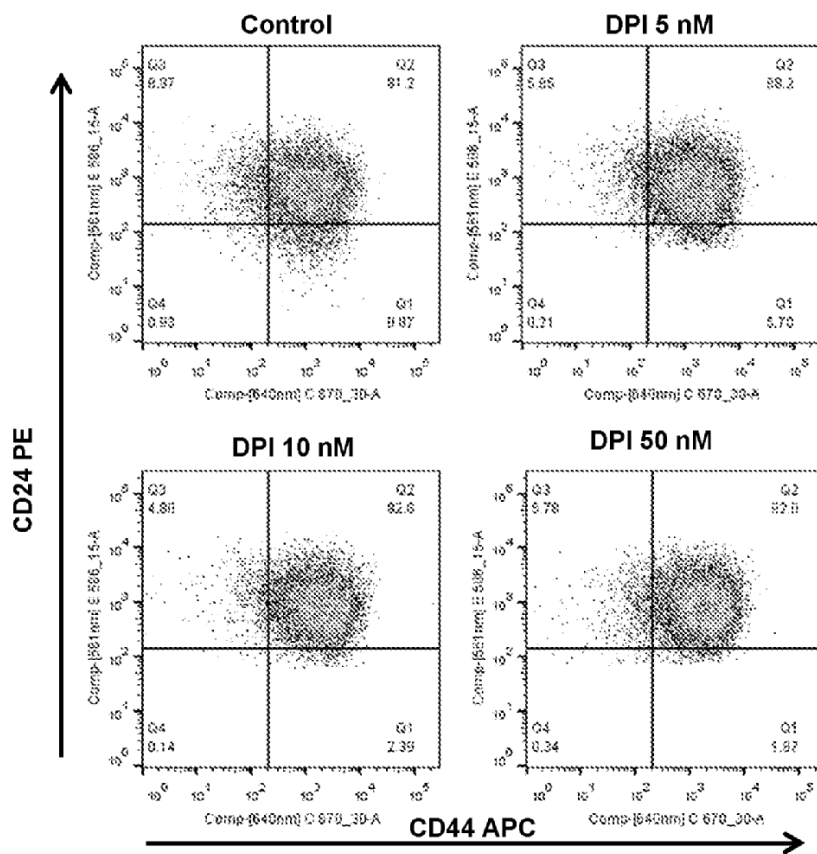
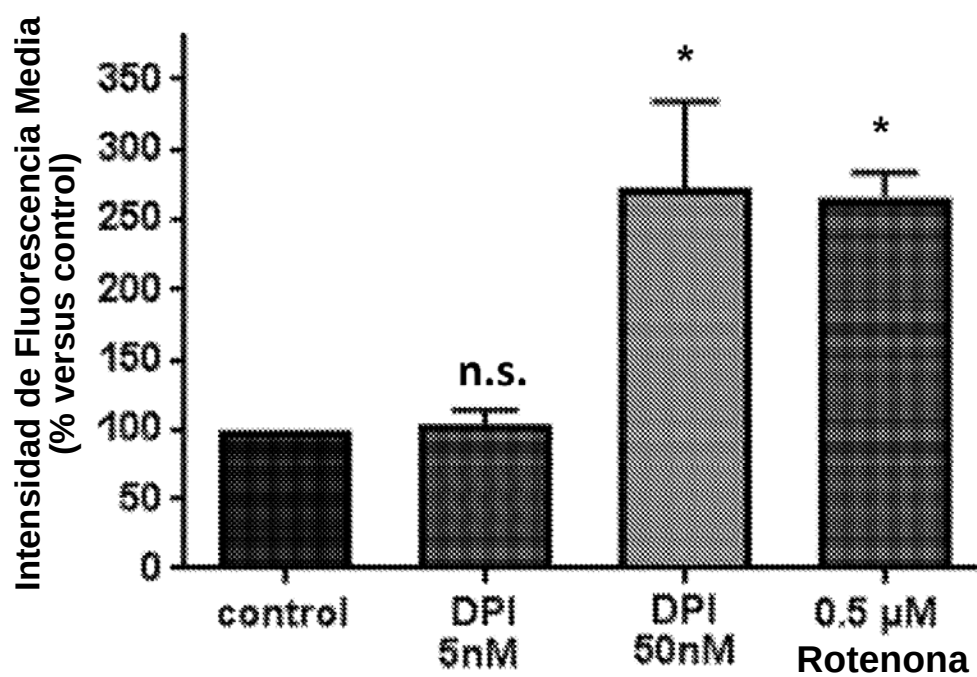
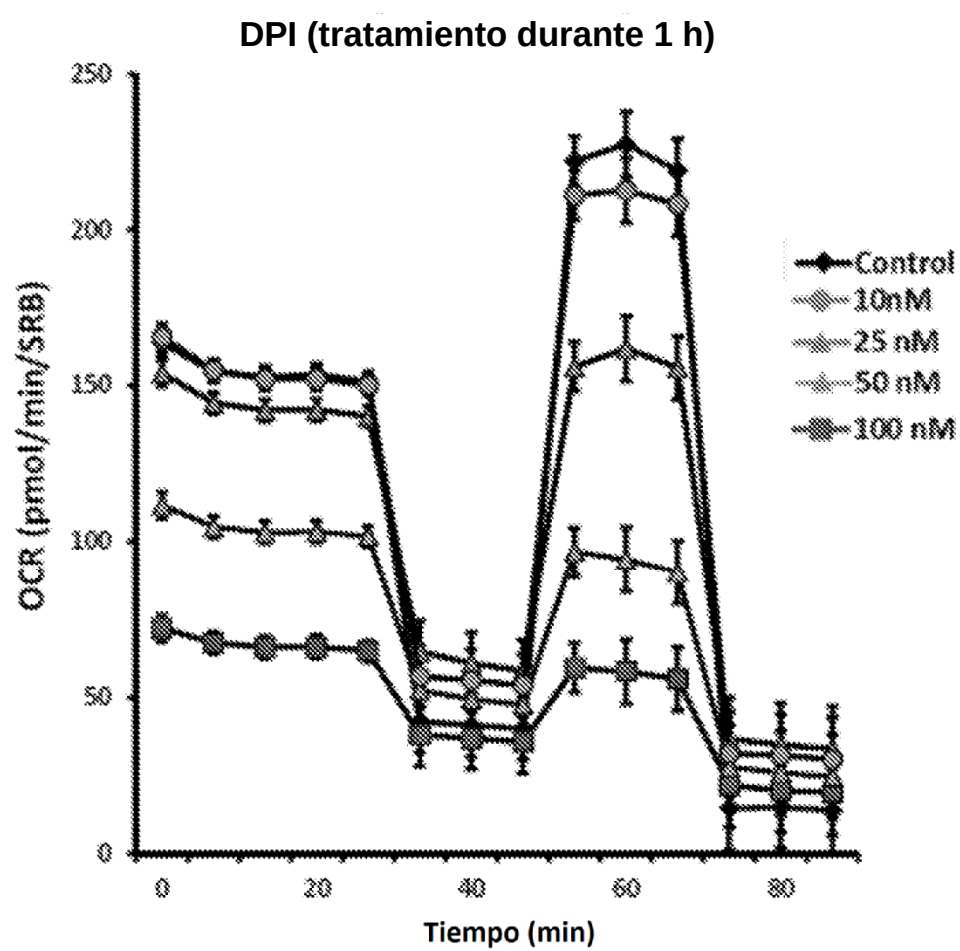
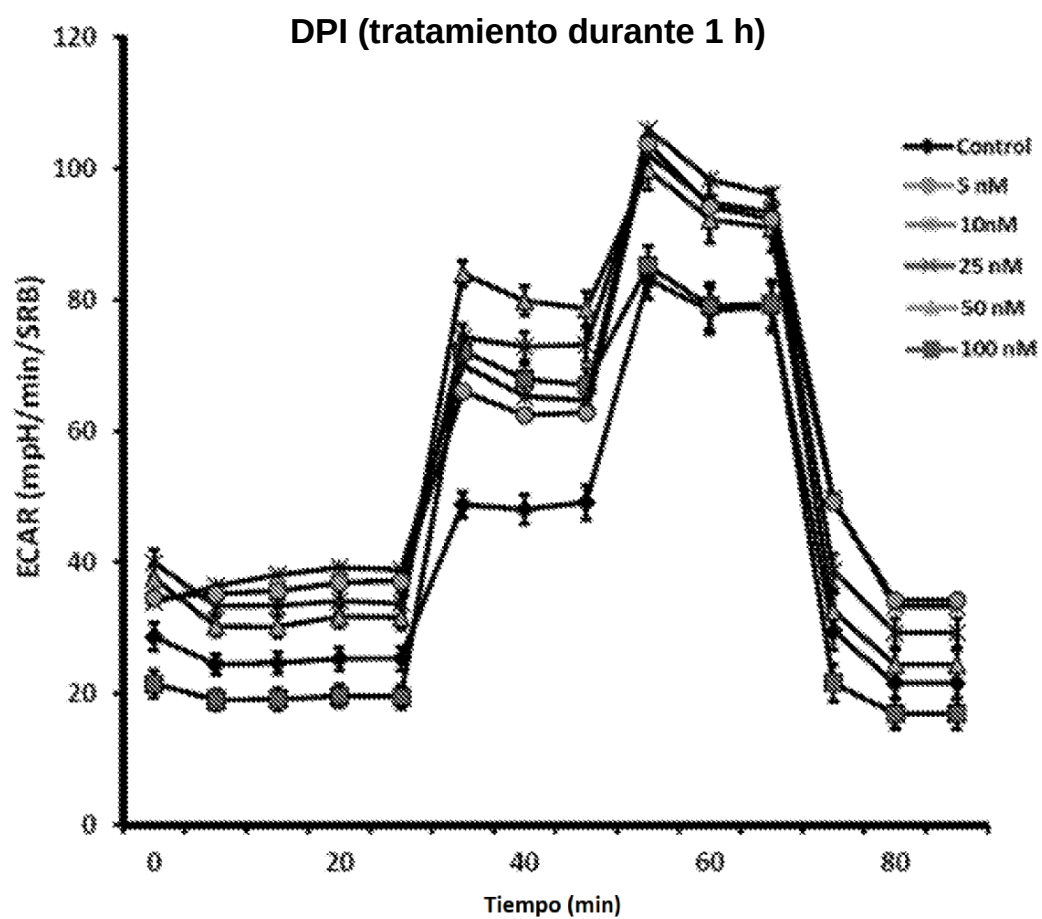


Figura 8B

**Figura 9**

**Figura 10**

**Figura 11**

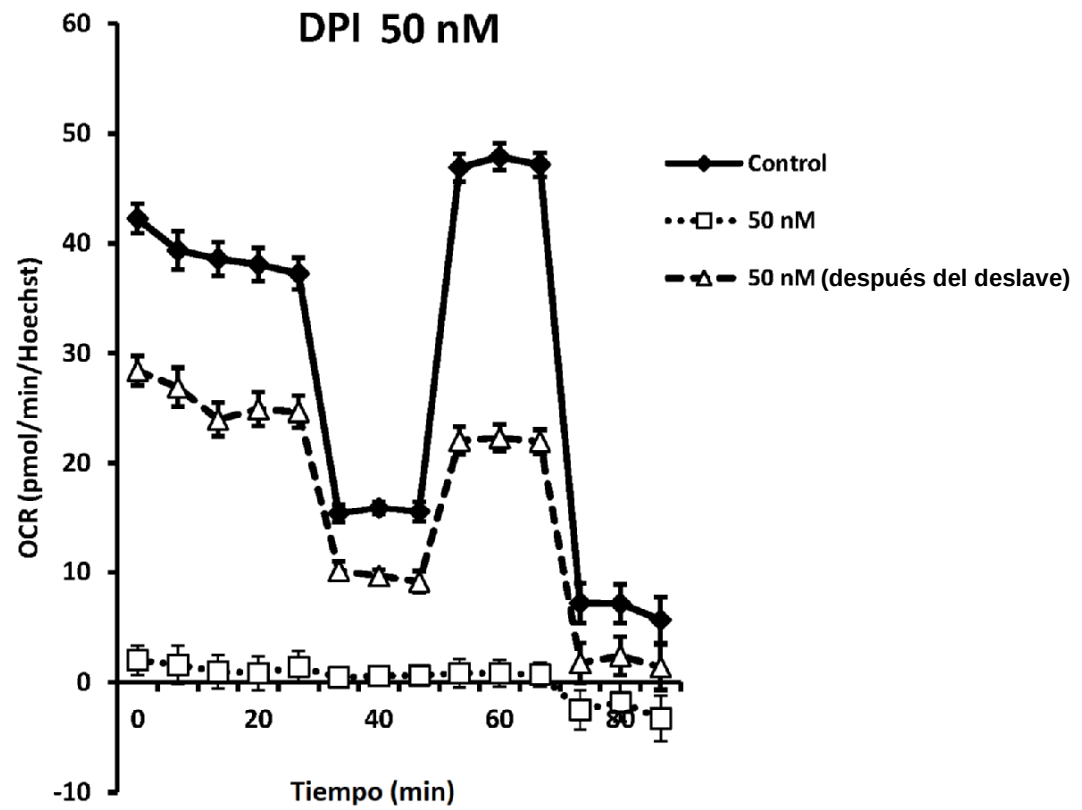


Figura 12A

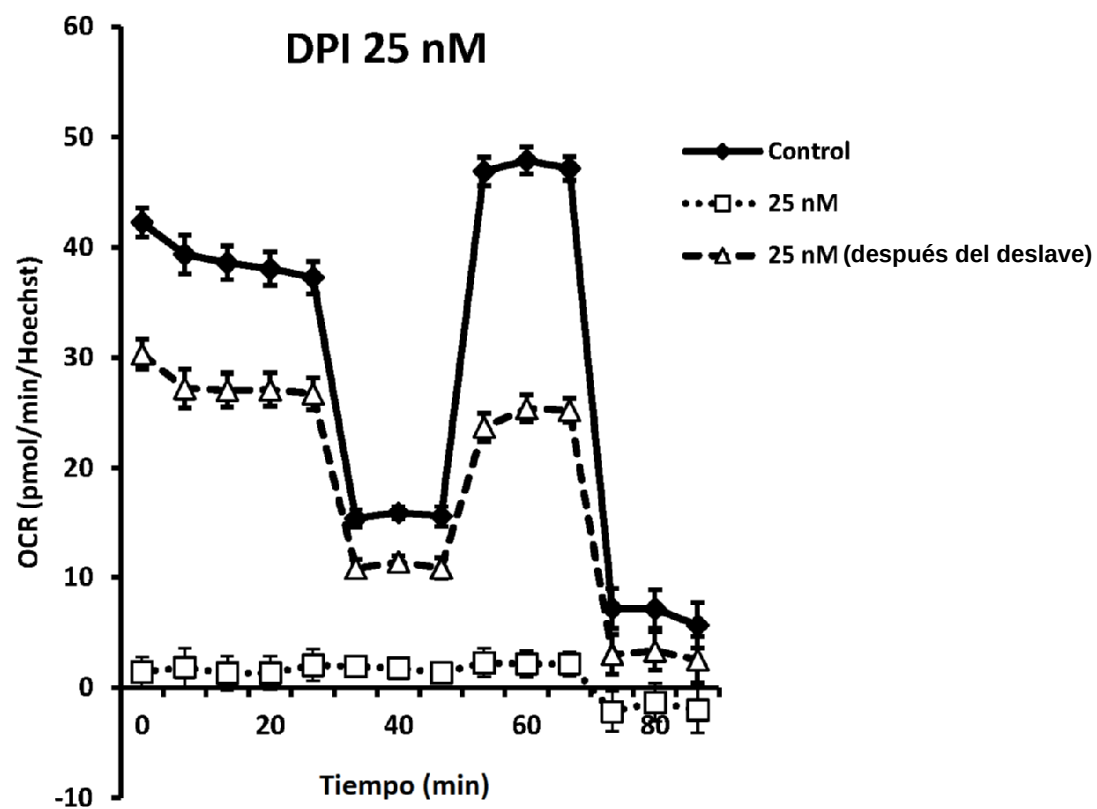
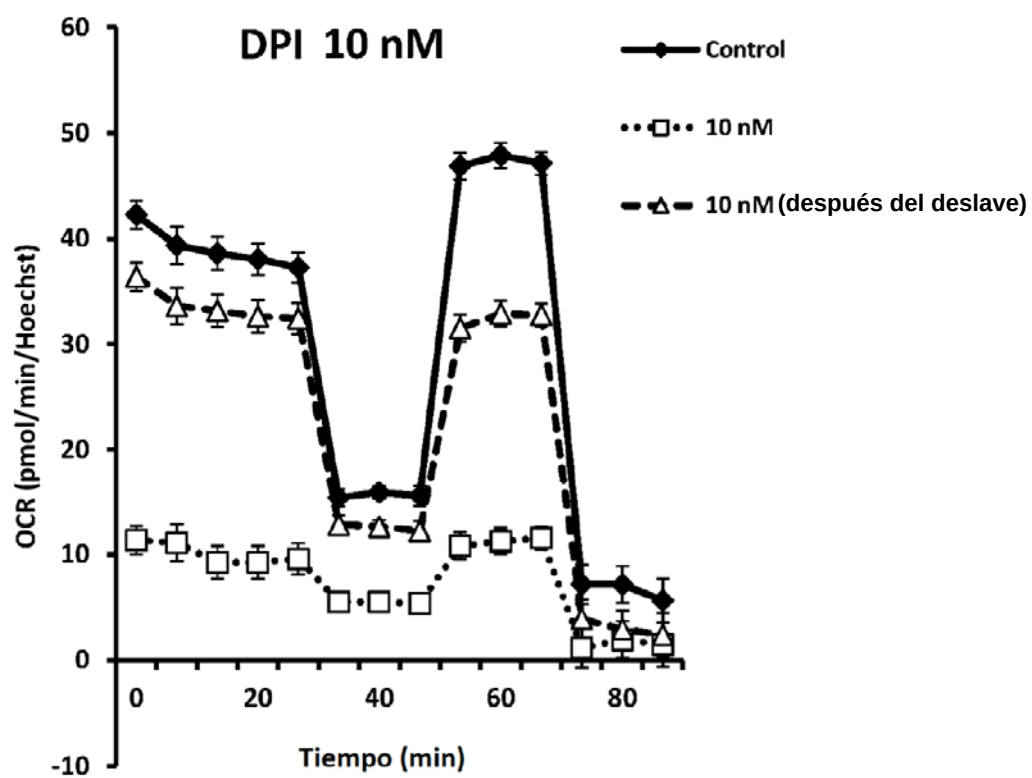
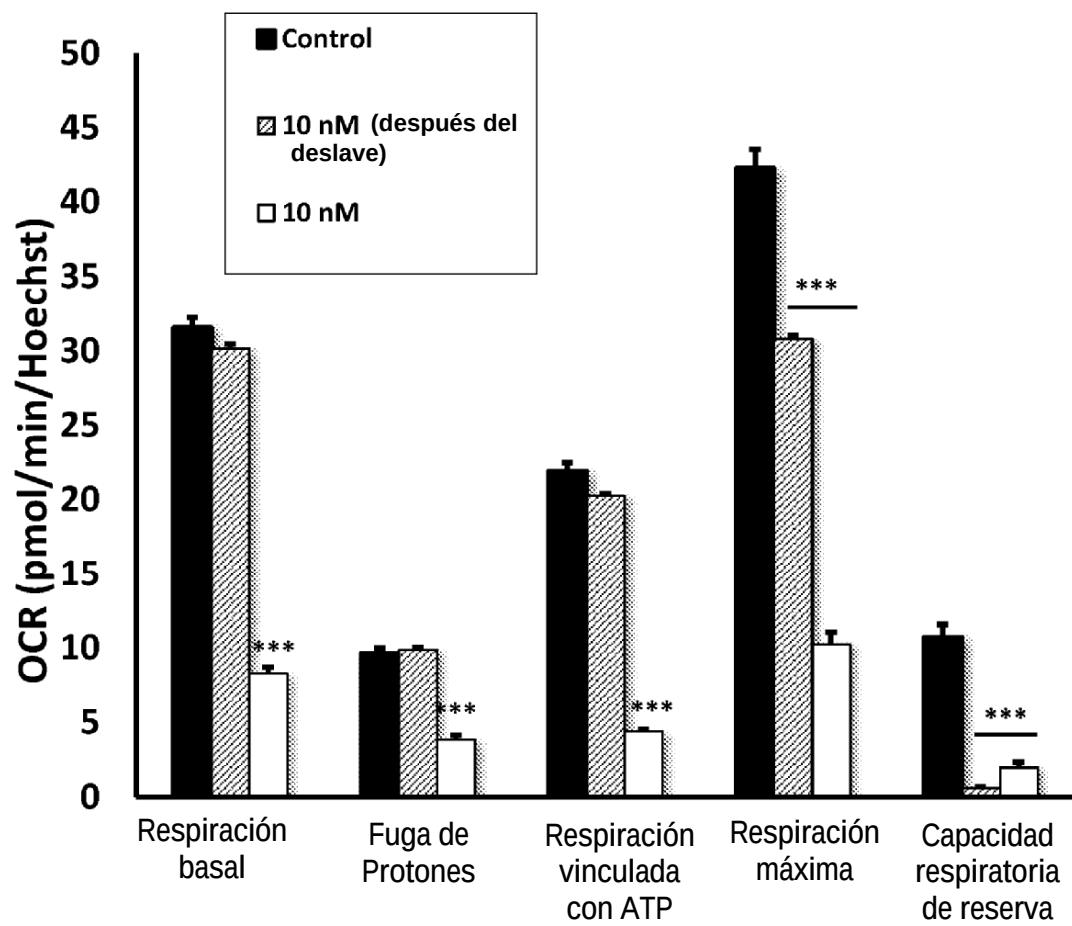
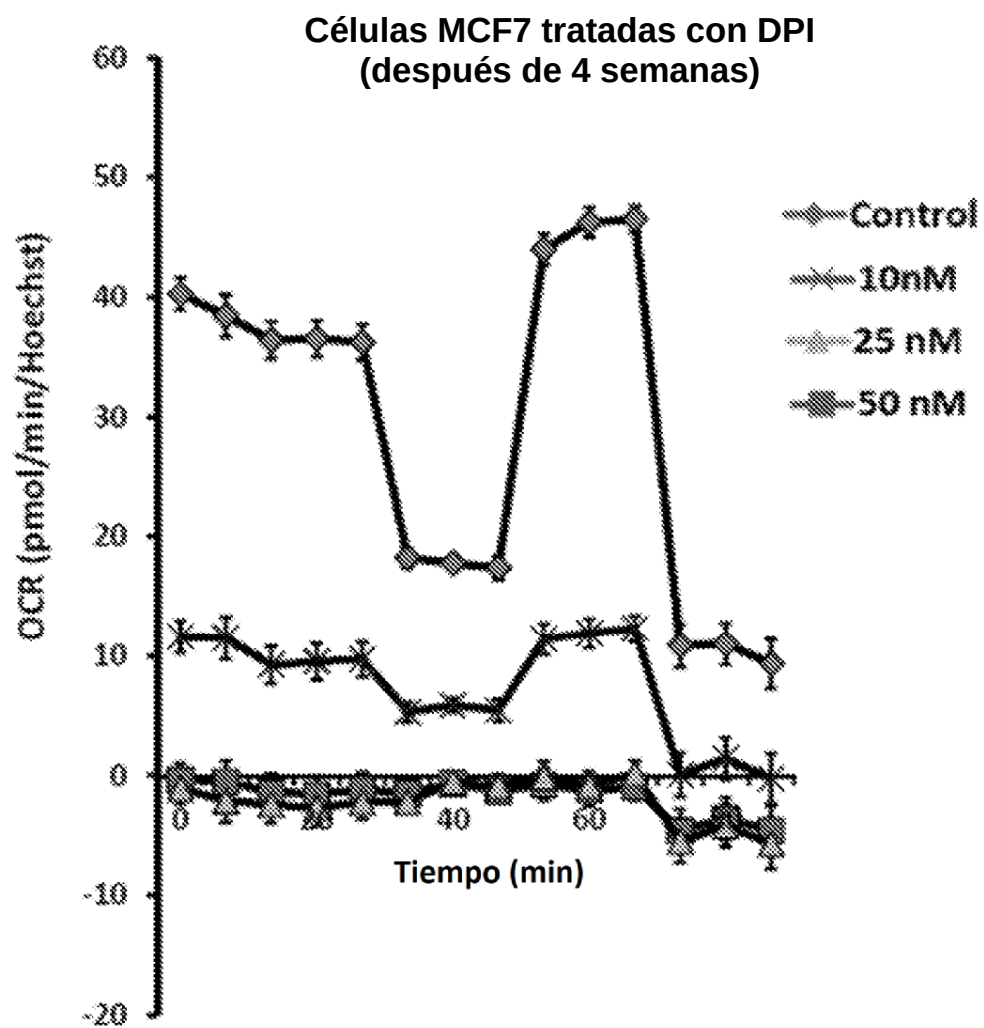
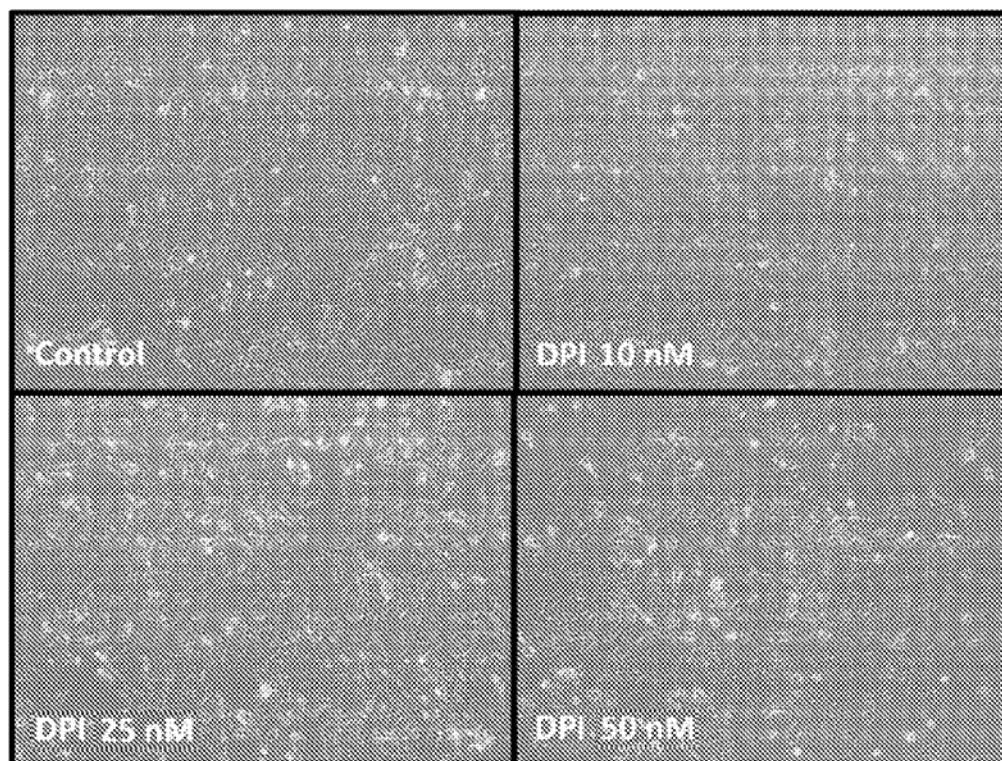


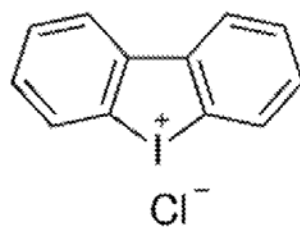
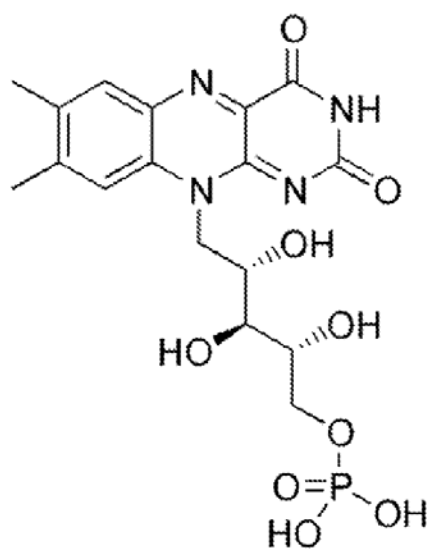
Figura 12B

**Figura 12C**

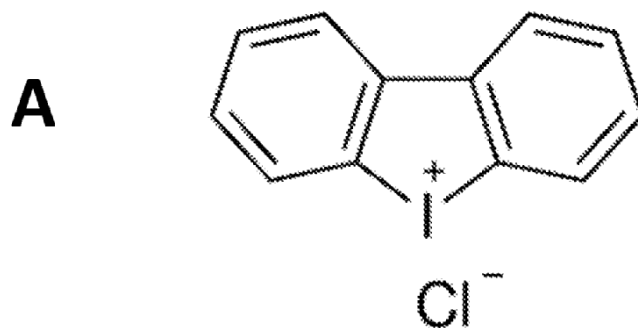
**Figura 13**

**Figura 14A**

**Figura 14B**

DPI**A****FMN****B****Figura 15**

Cloruro de difenilenyodonio



Cloruro de difenilyodonio

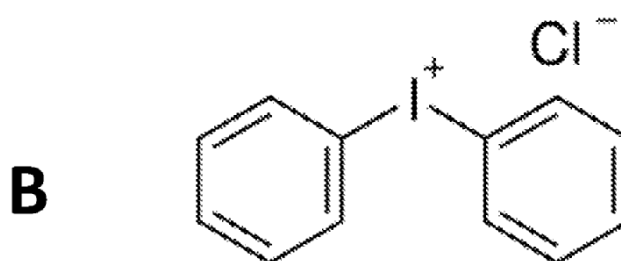
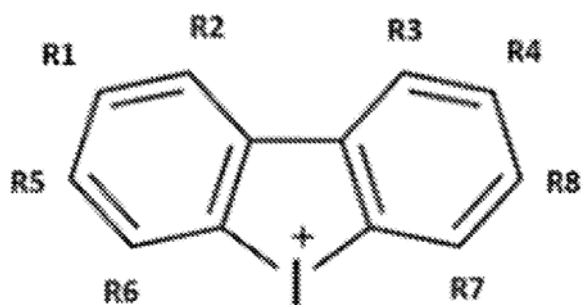


Figura 16

DPI



**Relacionado
con DPI**

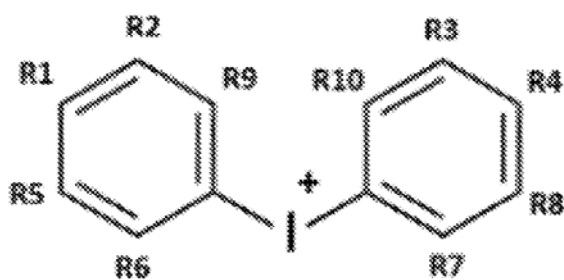
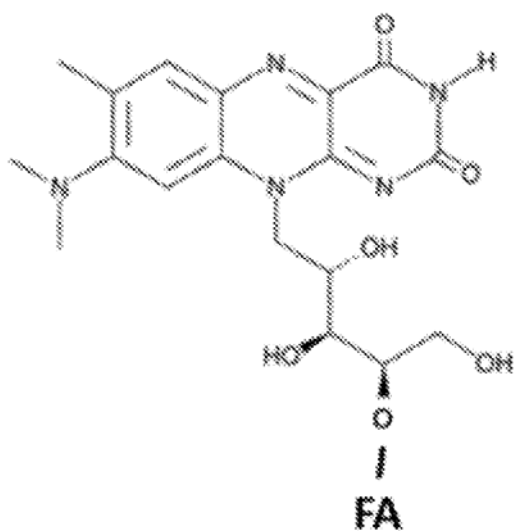


Figura 17

"Mitoflavinas"

Roseoflavina-FA



Roseoflavina-TPP

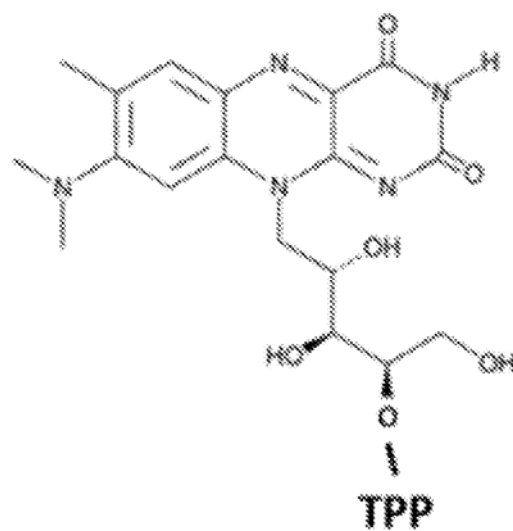


Figura 18