

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 534**

51 Int. Cl.:
C07C 327/26 (2006.01)
C07C 327/36 (2006.01)
C07C 69/76 (2006.01)
A61K 31/216 (2006.01)
A61K 31/265 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03757173 .4**
96 Fecha de presentación: **06.06.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1511713**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.03.2005**

54 Título: **COMPUESTOS QUE ANULAN EL PUNTO DE CONTROL G2 DEL CICLO CELULAR INDUCIDO POR DAÑOS EN EL ADN Y/O QUE INCREMENTAN LA ACTIVIDAD ANTICANCEROSA DE LOS TRATAMIENTOS QUE DAÑAN EL ADN.**

30 Prioridad:
06.06.2002 US 386930 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2011

73 Titular/es:
CanBas Co. Ltd.
2-2-1, Otemachi
NumazuShizuoka 410-0801, JP

72 Inventor/es:
KAWABE, Takumi y
KOBAYASHI, Hidetaka

74 Agente: **Curell Aguila, Marcelino**

ES 2 369 534 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos que anulan el punto de control G2 del ciclo celular inducido por daños en el ADN y/o que incrementan la actividad anticancerosa de los tratamientos que dañan el ADN.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos químicos que presentan una actividad de antiproliferación celular, y a la producción de los mismos, así como a las composiciones farmacéuticas que los contienen, y a métodos de tratamiento de trastornos proliferativos que utilizan dichos compuestos y composiciones. Por lo tanto, los compuestos de la invención resultan útiles para inhibir la proliferación celular y, de esta manera, para tratar los trastornos de proliferación celular, incluyendo el cáncer. En particular, la invención se refiere a compuestos que anulan el punto de control G2 del ciclo celular, incluyendo el punto de control G2 inducido por daños en el ADN, que resulta útil en el tratamiento de trastornos proliferativos tales como cáncer, incluyendo el tratamiento de tumores sólidos o líquidos metastásicos y no metastásicos.

15 **Antecedentes**

El ciclo celular comprende la etapa S (replicación del ADN), la etapa M (mitosis) y dos etapas de hueco (etapas G1 y G2) entre las etapas S y M. Los puntos de control del ciclo celular garantizan un avance preciso a través de los estadios del ciclo celular, e incluyen el seguimiento del estado de la integridad del ADN, de la replicación del ADN, del tamaño celular y del ambiente circundante (Maller, Curr. Opin. Cell Biol. 3:26, (1991)). Resulta especialmente importante para los organismos multicelulares mantener la integridad del genoma, y existen múltiples puntos de control que realizan un seguimiento del estado del genoma. Entre ellos se encuentran los puntos de control G1 y G2 antes de la replicación del ADN y la mitosis, respectivamente. Resulta crucial reparar o corregir los daños en el ADN antes de entrar en la etapa S, debido a que tras resultar dañado, el ADN se replica, dando lugar con frecuencia a mutaciones (Hartwell, Cell 71:543, (1992)).

El avance a través de los puntos de control G1 y G2 sin reparación de daños de consideración en el ADN induce la catástrofe mitótica y/o la apoptosis.

La mayoría de células de cáncer son portadoras de anomalías en las proteínas relacionadas con el punto de control G1 tales como p53, Rb, MDM-2, p16^{INK4} y p19^{ARF} (Levine, Cell 88:323, (1997)). Alternativamente, las mutaciones pueden provocar la sobreexpresión y/o sobreactivación de los productos oncogénicos, por ejemplo Ras, MDM-2 y ciclina D, que reducen la astringencia del punto de control G1. Además de dichas mutaciones, la señalización excesiva de factor de crecimiento puede estar causada por la sobreexpresión de factores de crecimiento y puede reducir la astringencia del punto de control G1. Conjuntamente con las mutaciones de pérdida de función y de ganancia de función, la activación continua de los receptores de factor de crecimiento o de moléculas transductoras de señal posteriores puede provocar la transformación celular al anular el punto de control G1. Un punto de control G1 interrumpido o anulado contribuye a tasas de mutación más altas y a las muchas mutaciones observadas en las células de cáncer. En consecuencia, la mayoría de las células de cáncer dependen del punto de control G2 para sobrevivir frente a daños excesivos en el ADN (O'Connor y Fan, Prog. Cell Cycle Res. 2:165, (1996)).

El punto de control G2 del ciclo celular restringe el inicio de la mitosis hasta que la replicación y la reparación del ADN se han completado. El mal funcionamiento del punto de control G2 permitiría un inicio prematuro de la mitosis antes de completarse la replicación y reparación del ADN, produciendo células hija que carecen de una parte sustancial del ADN genómico o portadoras de mutaciones. Las funciones del punto de control G2 comprenden la detección de daños al ADN y la generación de una señal que puede conducir a la detención del ciclo celular al detectarse daños en el ADN. El mecanismo que induce la detención en G2 del ciclo celular tras producirse daños en el ADN se cree que se encuentra conservado en especies que comprenden las levaduras hasta el ser humano. En presencia de ADN dañado, la Cdc2/ciclina B quinasa se mantiene inactiva mediante la fosforilación de los residuos treonina-14 y treonina-15 en la Cdc2 quinasa; alternativamente, puede reducirse el nivel de proteína ciclina B. Al inicio de la mitosis, la Cdc25 fosfatasa elimina los fosfatos inhibidores de la Cdc2/ciclina B quinasa, activando de esta manera la Cdc2/ciclina B quinasa. La activación de la Cdc2/ciclina B quinasa resulta equivalente al inicio de la etapa M.

En las levaduras de fisión, la proteína quinasa Chk1 resulta necesaria para la detención del ciclo celular en respuesta a daños en el ADN. La Chk1 quinasa actúa después de varios productos génicos rad y resulta modificada mediante fosforilación tras producirse daños en el ADN. Las quinasas Rad53 de las levaduras en gemación y las Cds1 de las levaduras de fisión es conocido que conducen señales procedentes del ADN no replicado. Aparentemente existe cierta redundancia entre Chk1 y Cds1 debido a que la eliminación de ambos, Chk1 y Cds1, culmina en la interrupción de la detención de G2 inducida por el ADN dañado. Resulta interesante que tanto Chk1 como Cds1 fosforilan Cdc25 y estimulan la unión de Rad24 a Cdc25, que secuestra Cdc25 hacia el citosol e impide la activación de Cdc2/ciclina B. Por lo tanto, aparentemente Cdc25 es una diana común de estas quinasas, lo que implica que esta molécula es un factor indispensable en el punto de control G2.

En el ser humano, tanto hChk1, un homólogo humano de la Chk1 de levadura de fisión, como Chk2/HuCds1, un homólogo humano de la Rad53 de levadura en gemación y la Cds1 de levadura de fisión, fosforilan Cd25C en la serina-216, un sitio de regulación crítico, en respuesta a daños en el ADN. Esta fosforilación crea un sitio de unión para las proteínas ácidas pequeñas 14-3-3s, homólogos humanos de Rad24 y Rad25 de las levaduras de fisión. El papel regulador de esta fosforilación queda claramente demostrado por el hecho de que la sustitución de la serina-216 por alanina en Cdc25C interrumpía la detención en G2 del ciclo celular en células humanas. Sin embargo, todavía no se entiende por completo el mecanismo del punto de control G2.

El documento WO 99/48495 describe unos métodos para inhibir la angiogénesis no deseada utilizando compuestos de fórmula general I.

La patente US nº 4.394.389 se refiere a un método de inhibición de la ribonucleótido reductasa que comprende administrar un compuesto según la fórmula general I en un mamífero portador de un tumor que presenta un nivel de ribonucleótido reductasa relativamente alto.

El documento WO 97/46228 da a conocer unos métodos de tratamiento del cáncer utilizando análogos de tiroxina que no presentan actividad hormonal significativa.

La patente US nº 5.200.550 describe ésteres aromáticos de fórmula general (I).

Sumario

La invención se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa los resultados del análisis de citometría de flujo del contenido de ADN de células Jurkat tras el tratamiento con bleomicina (40 µg/ml) o de bleomicina más CBDC402 a diversas concentraciones (0,2, 0,39, 0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25 y 50 µg/ml) durante 24 horas.

La figura 2 representa los resultados del análisis de citometría de flujo del contenido de ADN de las células Jurkat tras el tratamiento con colchicina (5 µg/ml) o con colchicina más CBDC402 a diversas concentraciones (0,2, 0,39, 0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25 y 50 µg/ml) durante 24 horas.

La figura 3a-b representa las actividades de diversos compuestos CBDC; la figura 3a representa una curva de dosis-respuesta para la anulación del punto de control G2 por parte de diversos compuestos CBDC, y la figura 3b ilustra las relaciones de estructura-actividad de los compuestos CBDC.

La figura 4 representa las estructuras, nombres químicos y códigos CBDC para determinados compuestos CBDC.

La figura 5 representa la estructura y actividades relativas de determinados compuestos CBDC.

La figura 6 representa los valores de IC₅₀ para la anulación del punto de control G2 por parte de determinados compuestos CBDC.

La figura 7 representa los resultados del análisis de citometría de flujo del contenido de ADN de células HCT116 tras el tratamiento con adriamicina (ADR), bleomicina (Bleo), comptotecina (Campto) y cisplatino (CDDP) durante 24 horas, tratándose a continuación las células sin CBDC004, o con 2 µM, 10 µM ó 50 µM de CBDC004.

La figura 8 representa los resultados del análisis de citometría de flujo de los resultados de citotoxicidad (% de población subG1) para células HCT116 tratadas con bleomicina (10 µg/ml), adriamicina (1 µg/ml), camptotecina (1 µg/ml) o cisplatino (CDDP, 10 µg/ml) y, dentro de cada régimen de tratamiento, las células se trataron sin CBDC004, o con 2 µM, 10 µM ó 50 µM de CBDC004; se determinó la población subG1 mediante tinción del as células con solución de Krishan.

La figura 9 representa el efecto sobre el crecimiento tumoral de CPT-11, CBDC402 o de una combinación de CPT11 y CBDC402, en el que células HCT116 de la línea celular de cáncer de colon humano se implantaron subcutáneamente en ratones SCID; se representaron en un gráfico los tamaños tumorales medios para cada grupo de tratamiento (n=4) frente al número de días tras el tratamiento.

La figura 10a-c representa los resultados del análisis de citometría de flujo que demuestra que el CBDC402 anula específicamente el punto de control G2 del ciclo celular inducido por daños en el ADN; la figura 10a demuestra que el CBDC402 anula el incremento inducido por bleomicina de células T normales activadas en etapa G2; la figura 10b demuestra que CBDC402 anula el gran incremento inducido por bleomicina de células T leucémicas (células Jurkat) en etapa G2; la figura 10c demuestra que el CBDC402 no afecta al incremento inducido por colchicina de células T

normales activadas en etapa M.

Descripción detallada de la invención

5 La invención proporciona unas composiciones y su utilización para el tratamiento de trastornos de proliferación celular. Específicamente, la invención proporciona unos compuestos que anulan el punto de control G2 del ciclo celular, que pueden utilizarse para tratar trastornos de proliferación celular tales como los asociados al cáncer. La invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos de la invención en un portador o excipiente adecuado, en las que dichas composiciones pueden incluir principios activos adicionales, tales como agentes que dañan el ADN. La invención proporciona métodos para utilizar compuestos de la invención y composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de la invención, para suprimir o eliminar células proliferantes, en particular células con trastornos de la proliferación. Asimismo, la invención proporciona unos métodos *in vitro* para utilizar los compuestos de la invención para sensibilizar selectivamente una célula a otros agentes o tratamientos, incluyendo agentes que dañan el ADN.

Definiciones

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el significado entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos siguientes presentan los significados atribuidos a los mismos, a menos que se indique lo contrario.

La expresión "anular el punto de control G2 del ciclo celular" o "inhibir el punto de control G2 del ciclo celular" o "interrumpir el punto de control G2 del ciclo celular" o "anulación del punto de control G2", o cualquier equivalente gramático de los mismos, se refiere a la capacidad de los compuestos de la invención de anular la capacidad de una célula de detener el ciclo celular en el punto de control G2. La anulación del punto de control G2 del ciclo celular incluye la anulación bajo condiciones en la célula que de otro modo provocarían la detención del ciclo celular en G2, tales como la acumulación de daños en el ADN por parte de, por ejemplo, determinados agentes antitumorales, irradiación de rayos X, irradiación de rayos gamma, irradiación UV o hipertermia. La anulación del punto de control G2 bajo dichas condiciones se considera "anulación del punto de control G2", aunque más particularmente, la anulación del "punto de control G2 inducido por daños en el ADN", en la que se hace referencia a que el punto de control G2 inducido por daños en el ADN incluye el reconocimiento de los daños en el ADN y la generación de una señal que normalmente produce la detención del ciclo celular en G2. Una célula en la que el punto de control G2 del ciclo celular ha sido anulado muestra una reducción del periodo de tiempo durante el que la célula se encuentra en el punto de control G2, que puede encontrarse comprendido entre la ausencia total del punto de control G2 (detención del punto de control G2) y un punto de control G2 que presenta una reducción en duración de minutos, horas, días, semanas o más bajo condiciones apropiadas. De esta manera, una célula puesta en contacto con un compuesto de la invención presenta un tiempo del punto de control G2 de menor duración que el que presentaría la célula en ausencia del compuesto. Por ejemplo, una reducción de la duración del tiempo del punto de control G2 significaría que una célula que se encuentra en G2 durante un determinado tiempo, por ejemplo 4 horas, al ponerse en contacto con un compuesto de la invención, se encontraría en G2 durante menos de 4 horas, por ejemplo 3,5, 3, 2,5, 2, 1 ó menos horas. La expresión "anulación de G2" o "anulación del punto de control G2" o "actividad inhibidora del punto de control G2" o cualquier equivalente gramatical, se refiere a cualquier magnitud de anulación o inhibición del punto de control G2.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "apoptosis" se refiere a la muerte celular programada, y a los cambios asociados en la fisiología celular, incluyendo la fragmentación de ácidos nucleicos, la activación de la caspasa, la condensación de los cromosomas, tal como se entiende en la técnica. La expresión "catástrofe mitótica" se refiere a la muerte celular resultante de un error en el proceso mitótico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "tratamiento que daña el ADN" y "agente que daña el ADN" se refieren a cualquier régimen de tratamiento que daña directa o indirectamente el ADN. Entre los ejemplos específicos de agentes que dañan el ADN se incluyen agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, alcaloides vegetales, extractos vegetales e isótopos radioactivos. Entre los ejemplos específicos de agentes también se incluyen fármacos que dañan el ADN, por ejemplo 5-fluorouracilo (5-FU), capacitabina, S-1 (Tegafur, 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina y ácido oxónico), 5-etiniluracilo, arbinosil-citosina (ara-C), 5-azacitidina (5-AC), 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina (dFdC), antimetabolitos de purinas (mercaptapurina, azatiopurina, tioguanina), hidrocloreto de gemcitabina (Gemzar), pentostaina, alopurinol, 2-fluoro-arabinosil-adenina (2F-ara-A), hidroxourea, mostaza azufrada (sulfuro de biscloroetilo), mecloretamina, melfalán, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, tioteap, AZQ, mitomicina C, dianhidrogalactitol, dibromoducitol, sulfonato de alquilo (busulfán), nitrosoureas (BCNU, CCNU, 4-metil-CCNU o ACNU), procarbacin, decarbacin, rebecamicina, antraciclinas tales como doxorubicina (adriamicina, ADR), daunorubicina (cerubicina), idarrubicina (idamicina) y epirubicina (Ellence), análogos de antraciclina tales como mitoxantrona, actinomomicina D, inhibidores no intercalantes de la topoisomerasa tales como epipodofilotoxinas (etopósido=VP16, tenipósido=VM-26), podofilotoxina, bleomicina (Bleo), pepleomicina, compuestos que forman compuestos con ácidos nucleicos, incluyendo derivados de platino, por ejemplo cisplatino (CDDP), análogo trans del cisplatino, carboplatino, iproplatino, tetraplatino y oxaliplatino, así como camptotecina, topotecán, irinotecán (CPT-

11) y SN-38. Entre los ejemplos específicos de tratamientos que dañan los ácidos nucleicos se incluyen la radiación, por ejemplo la radiación ultravioleta (UV), de infrarrojos (IR) o la radiación α , β o γ , así como el choque ambiental, por ejemplo la hipertermia. El experto en la materia podrá identificar y utilizar otros agentes y tratamientos que dañan el ADN.

5 La expresión "compuesto de la invención" pretende referirse a una molécula que presenta la estructura y actividad dada a conocer en la presente memoria. Un compuesto de la invención puede aislarse en forma pura, sustancialmente pura o puede encontrarse en una composición que contenga una mezcla de otros componentes. La pureza de una composición que contiene un compuesto de la invención puede determinarse, por ejemplo, utilizando técnicas de química analítica tales como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Una composición tal como se proporciona en la presente memoria puede contener uno o más compuestos de la invención, en una mezcla con portadores y excipientes adecuados, e principios activos adicionales, incluyendo agentes que dañan el ADN.

15 La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para la utilización farmacéutica, por ejemplo como agente anticanceroso, en un sujeto. El sujeto puede ser un ser humano que necesita de tratamiento para un trastorno de la proliferación celular. Una composición farmacéutica de la invención es una formulación que comprende una cantidad farmacológicamente efectiva de por lo menos un compuesto de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "trastorno proliferativo" y "estado proliferativo" se refieren a cualquier estado fisiológico de tipo patológico o no patológico caracterizado por la proliferación aberrante o no deseable de por lo menos una célula, incluyendo los estados caracterizados por la proliferación celular no deseable o no deseada o los estados de supervivencia celular caracterizados por una apoptosis deficiente o aberrante, así como estados caracterizados por una supervivencia celular aberrante o no deseable o no deseada. La expresión "trastorno de la diferenciación" se refiere a cualquier estado fisiológico de tipo patológico o no patológico caracterizado por la diferenciación aberrante o deficiente.

30 El término "sujeto" se refiere a animales, típicamente a animales mamíferos, tales como primates (seres humanos, monos, gibones, chimpancés, orangutanes, macacos), animales domésticos (perros y gatos), animales de granja (caballos, vacas, cabras, ovejas, cerdos) y animales experimentales (ratones, ratas, conejos, cobayas). Los sujetos comprenden los modelos de enfermedad animal (por ejemplo ratones portadores de tumores).

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyendo los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a un "compuesto" incluye una pluralidad de compuestos, y la referencia a "un residuo" o a un "aminoácido" incluye la referencia a uno o más residuos y aminoácidos.

40 *Anulación del punto de control G2*

Aunque la invención no se encuentra limitada a un mecanismo de acción particular, se ha observado que los compuestos de la invención pueden anular el punto de control G2 en las células proliferantes. El punto de control G2 del ciclo celular restringe el inicio de la mitosis hasta que se haya completado la replicación y la reparación del ADN, y la interrupción del punto de control G2 permitiría el inicio prematuro de la mitosis antes de completarse la replicación y reparación del ADN. Sin pretender vincularse a dicha teoría, se cree que, en células que han acumulado daños en el ADN, la anulación del punto de control G2 por parte de compuestos de la invención implica que las células no presentarán una oportunidad para corregir o reparar los daños en el ADN en el punto de control G2 y, por el contrario, procederán a través de G2 sin reparación del ADN, conduciendo a una catástrofe mitótica, apoptosis u otros estados que resultan en la supresión o muerte celular.

50 Según un aspecto, la invención proporciona compuestos para la utilización en la anulación de la detención del ciclo celular en G2 inducido por daños en el ADN. Existen diferencias significativas en las respuestas del ciclo celular, en particular en el punto de control G2, en las células normales y en las células con el ADN dañado. El punto de control G2 inducido por daños incluye el reconocimiento de los daños en el ADN y la generación de una señal que produce la detención del ciclo celular. La invención proporciona compuestos que anulan selectivamente el punto de control G2 inducido por daños en el ADN.

60 Según otro aspecto, la invención proporciona compuestos y composiciones farmacéuticas que sensibilizan las células frente a agentes y tratamientos que dañan el ADN. La invención proporciona métodos *in vitro* para sensibilidad células frente a agentes y tratamientos que dañan el ADN.

65 Según otro aspecto, la invención proporciona compuestos y composiciones farmacéuticas que reconocen selectivamente las células con el ADN dañado. En una forma de realización, las células con daños preexistentes en el ADN se tratan con compuestos de la invención que anulan el punto de control G2, y las células con ADN dañado proceden a través de la etapa G2, resultando en la muerte o supresión celular (habitualmente la catástrofe mitótica o la apoptosis). En otra forma de realización, las células se tratan con una combinación de por lo menos un agente

que daña el ADN y por lo menos un compuesto de la invención, resultando en una tasa más alta de muerte o supresión celular que la tasa observada al utilizar únicamente agentes que dañan el ADN.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos y composiciones farmacéuticas que reconocen selectivamente células con un punto de control G1 del ciclo celular alterado, en particular células cancerosas. La invención proporciona compuestos para reconocer selectivamente células con un punto de control G1 del ciclo celular alterado, en particular células cancerosas, mediante la puesta en contacto de las células con por lo menos un compuesto de la invención en una cantidad suficiente para anular el punto de control G2 del ciclo celular. Sin pretender vincularse a dicha teoría, las células con un punto de control G1 del ciclo celular alterado no reparan los daños en el ADN antes de G1 y la anulación del punto de control G2 por parte de compuestos de la presente invención implica que estas células proceden a través de la mitosis sin reparar los daños acumulados en el ADN. La falta de un punto de control G2 efectivo tras producirse daños en el ADN resulta fatal para la célula que presenta un defecto en el punto de control G1. En el caso de que la célula progrese a través de G2 sin reparar suficientemente los daños en el ADN, estos daños pueden conducir a una catástrofe mitótica o apoptosis.

Según un aspecto, la presente invención proporciona compuestos que reconocen selectivamente las células cancerosas, y eliminan o suprimen el crecimiento de las mismas. La invención proporciona además compuestos para reconocer selectivamente las células cancerosas, y para eliminar o suprimir el crecimiento de las mismas, mediante la puesta en contacto de las células con por lo menos un compuesto de la invención en una cantidad suficiente para anular el punto de control G2. Muchas células cancerosas presentan mutaciones en genes implicados en la detención del ciclo celular en el punto de control G1, incluyendo genes supresores tumorales alterados tales como *p53*, *Rb*, *p16INK4*, y *p19ARF*, y/o mutaciones que provocan la expresión de los oncogenes tales como MDM-2 y ciclina D. Además, la anulación del punto de control G1 puede conducir a la transformación de las células normales en células cancerosas, ya que una señalización excesiva de factor de crecimiento causada por la sobreexpresión de factores de crecimiento, puede conducir a un estado en el que los receptores de factor de crecimiento o las moléculas transductoras de señales posteriores provoquen la transformación celular mediante la anulación del punto de control G1. En contraste, pocos cánceres presentan alteraciones de puntos de control G2 de detención del ciclo celular. De esta manera, el punto de control G2 habitualmente se conserva en las células cancerosas con un punto de control G1 alterado. La interrupción selectiva del punto de control G2 provocaría que las células cancerosas con un punto de control G1 alterado fuesen más sensibles al tratamiento que daña en el ADN, en comparación con células normales con un punto de control G1 intacto, debido a que el progreso a través de G1 y G2 sin reparar dichos daños induce la apoptosis o la catástrofe mitótica. Sin pretender vincularse a dicha teoría, los compuestos de la presente invención alteran (anulan) selectivamente el punto de control G2 en las células cancerosas, provocando de esta manera que las células cancerosas con un punto de control G1 alterado resulten más sensibles al tratamiento que daña en el ADN. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la invención proporciona compuestos que sensibilizan las células cancerosas con alteración del punto de control G1 respecto a agentes y tratamientos que provocan daños en el ADN.

Según otro aspecto de la invención, los compuestos de la invención pueden reconocer selectivamente las células cancerosas con un efecto citotóxico reducido o nulo en células normales. Sin pretender vincularse a dicha teoría, se propone que una célula normal en la que el punto de control G2 ha sido anulado por un compuesto de la invención sufrirá pocas o ninguna consecuencia perjudicial al entrar en la etapa G2 y experimentar mitosis sin un punto de control G2 funcional; en contraste, la anulación del punto de control G2 con el ADN dañado en una célula con ADN dañado, por parte de un compuesto de la invención, se espera que presente severos efectos citotóxicos, conduciendo a la apoptosis o a la catástrofe mitótica. De esta manera, la invención proporciona compuestos para reconocer selectivamente las células con el ADN dañado, tales como células cancerosas, con poco o ningún efecto citotóxico sobre las células normales (no dañadas), mediante la puesta en contacto de las células con por lo menos un compuesto de la invención en una cantidad suficiente para anular el punto de control G2. La invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen por lo menos un compuesto de la invención adecuado para la utilización en métodos para reconocer selectivamente las células con el ADN dañado, tales como células cancerosas, con poco o ningún efecto citotóxico sobre las células normales (no dañadas).

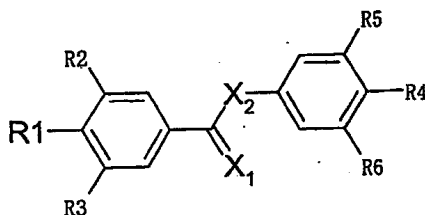
Según todavía otro aspecto de la invención, los compuestos de la invención pueden sensibilizar selectivamente las células, en particular las células cancerosas, frente a los efectos de eliminación celular de los agentes que dañan el ADN, con poco o ningún efecto citotóxico sobre las células normales. La mayoría de los agentes anticancerosos convencionales reconoce las células proliferantes con independencia de si son células cancerosas o células normales, con el resultado de que la mayoría de medicinas anticancerosas convencionales dan lugar a efectos secundarios tales como náusea, diarrea o pérdida de pelo. En contraste, los compuestos de la presente invención reconocen selectivamente las células con un punto de control G1 alterado, u otros tipos de daños en el ADN, y por lo tanto presentan un efecto citotóxico reducido o nulo sobre las células normales.

La invención proporciona compuestos para inducir la apoptosis o la catástrofe mitótica en una célula mediante la puesta en contacto de la célula con por lo menos un compuesto de la invención en una cantidad suficiente para anular el punto de control G2. La invención proporciona además compuestos para inducir la apoptosis o la catástrofe mitótica en una célula mediante la puesta en contacto de la célula con por lo menos una composición farmacéutica de la invención en una cantidad suficiente para anular el punto de control G2. La célula puede ser una célula con el

ADN dañado, en particular una célula cancerosa.

La invención proporciona compuestos para inducir la apoptosis o la catástrofe mitótica en una célula mediante la puesta en contacto de la célula con un agente o tratamiento que provoca daños en el ADN y por lo menos un compuesto de la invención en una cantidad suficiente para anular el punto de control G2 y de esta manera sensibilizar la célula frente al agente o tratamiento que provoca daños en el ADN. La célula puede ser una célula cancerosa. La célula cancerosa puede presentar un punto de control del ciclo celular en G1 alterado. El agente o tratamiento que daña el ADN puede ser 5-fluorouracilo (5-FU), rebecamicina, adriamicina, bleomicina, cisplatino, hipertermia, radiación UV, irradiación gamma u otro agente o tratamiento que provoca daños en el ADN suficiente para causar un daño.

La invención proporciona compuestos que, administrados en una célula, anulan el punto de control G2, en particular el punto de control G2 inducido por daños en el ADN, y eliminan o suprimen células, con o sin tratamiento que provoca daños en el ADN, en el que los compuestos presentan la estructura general siguiente:



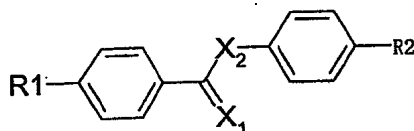
en la que:

R₁ es cloro (Cl), bromo (Br), flúor (F) o yodo (I).

R₂, R₃, R₄, R₅ y/o R₆ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F), yodo (I), metilo (CH₃), O-metilo (OCH₃), hidroxilo (OH), CH(CH₃)₂, CHO, CHOCH₃, O(CH₂)_nCH₃, OCO(C₆H₁₂)Cl, COOCH₃ o hidrógeno en el caso de R₂, R₃, R₅ o R₆. X₁ es nitrógeno (NH), oxígeno (O) o azufre (S); X₂ es oxígeno (O) o azufre (S).

Se encuentran formas de realización ilustrativas en los dibujos, especialmente en las figuras 3, 4, 5 y 6, aunque los compuestos de la invención no se encuentran limitados por dichas formas de realización.

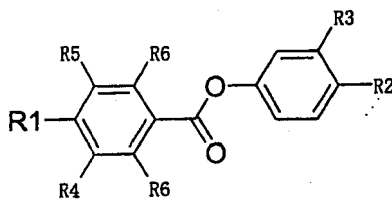
La invención proporciona compuestos que, administrados en una célula, anulan el punto de control G2, en particular el punto de control G2 inducido por daños en el ADN, y eliminan o suprimen células con o sin tratamiento que provoca daños en el ADN, en el que los compuestos presentan la estructura general siguiente:



en la que R₁ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F) o yodo (I);

R₂ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F), yodo (I), metilo (CH₃), O-metilo (OCH₃), hidroxilo (OH), CH(CH₃)₂, CHO, CHOCH₃, O(CH₂)_nCH₃, OCO(C₆H₁₂)Cl o COOCH₃; X₁ es nitrógeno (NH), oxígeno (O) o azufre (S); X₂ es oxígeno (O) o azufre (S). Se encuentran formas de realización ilustrativas en los dibujos, especialmente en las figuras 3, 4, 5 y 6.

En la presente memoria se describen compuestos que anulan el punto de control G2 y/o suprimen o eliminan células cancerosas, con o sin tratamiento que provoca daños en el ADN, en el que los compuestos presentan la estructura general siguiente:



en la que la sustitución de diferentes moléculas en las posiciones R₁ a R₆ afecta a la actividad de anulación del punto de control G2 de los compuestos resultantes. Se han determinado las relaciones de estructura-actividad

siguientes:

En R₁, el bromo (Br) proporciona una actividad más alta que el cloro (Cl), el flúor (F) o el metilo (CH₃);

5 En R₂, el metilo (CH₃) o el O-metilo (OCH₃) proporcionan una actividad más alta que el hidróxido (OH), el bromo (Br), el cloro (Cl), CH(CH₃)₂, CHO, CHOCH₃, O(CH₂)_nCH₃, OCO(C₆H₁₂)Cl o COOCH₃ o H.

En R₃, el metilo (CH₃) proporciona una actividad más alta que H u O-metilo (OCH₃).

10 En R₄ puede utilizarse bromo (Br), flúor (F), cloro (Cl) o H.

En R₅ puede utilizarse bromo (Br), flúor (F), cloro (Cl) o H.

15 En R₆ puede utilizarse bromo (Br), flúor (F), cloro (Cl) o H.

La lista anterior es únicamente ilustrativa y no limitativa. Se proporcionan formas de realización ilustrativas en las figuras 3, 4, 5 y 6. El experto en la materia podrá realizar sustituciones y determinaciones de actividad adicionales según las enseñanzas de la presente exposición, con el fin de obtener compuestos adicionales de la invención. El experto en la materia apreciará que, aunque se ha observado que determinadas sustituciones producen estructuras con una actividad más alta que otras estructuras con respecto a la anulación del punto de control G2 inducido por daños en el ADN, la invención proporciona compuestos con todas las sustituciones y todos los niveles de actividad. Para una forma de realización particular, el experto en la materia considera múltiples factores durante la selección de un compuesto de la invención para la utilización en dicha forma de realización, además de la actividad de un compuesto contra una diana particular. El experto en la materia considerará la actividad del compuesto, la disponibilidad, la estabilidad, la facilidad o eficiencia de síntesis, la conveniencia para la formulación en una composición farmacéutica, la farmacabilidad, la interacción con otros compuestos *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, la capacidad de eliminar células, la capacidad de suprimir el crecimiento de células, los efectos sobre las células normales y otras actividades.

30 La invención proporciona compuestos que anulan el punto de control G2, en particular compuestos que anulan selectivamente el punto de control G2 del ciclo celular inducido por daños en el ADN. Se proporcionan compuestos que anulan selectivamente el punto de control G2 del ciclo celular inducido por daños en el ADN en células defectivas en el punto de control G1, tales como células cancerosas, y anulan selectivamente el punto de control G2 inducido por daños en el ADN en células tratadas con agentes que provocan daños en el ADN. La invención proporciona compuestos que sensibilizan las células cancerosas frente a los tratamientos que provocan daños en el ADN. Se proporcionan además compuestos que inhiben el crecimiento tumoral de xenoinjertos, solos o en combinación con agentes anticancerosos. La invención proporciona compuestos que suprimen la formación de colonias *in vitro* en células de cáncer, solos o en combinación con agentes anticancerosos. En particular, la invención proporciona compuestos que anulan el punto de control G2 y/o suprimen o eliminan las células cancerosas, con o sin tratamiento que provoca daños en el ADN, que comprenden de manera no limitativa:

CBDC004:	4-metoxi-fenil-éster del ácido 4-clorobenzoico
CBDC401:	p-tolil-éster del ácido 4-cloro-benzoico
CBDC402:	p-tolil-éster del ácido 4-bromo-benzoico
CBDC403:	p-tolil-éster del ácido 3,4,5-trifluoro-benzoico
CBDC404:	4-bromo-fenil-éster del ácido 4-fluoro-benzoico; compuesto con etano
CBDC405:	p-tolil-éster del ácido 3,4-dicloro-benzoico; compuesto con etano
CBDC406:	p-tolil-éster del ácido 2,4-dicloro-benzoico; compuesto con etano
CBDC407:	p-tolil-éster del ácido 4-fluoro-benzoico; compuesto con etano
CBDC408:	p-tolil-éster del ácido 2,3,4,5,6-pentafluoro-benzoico; compuesto con etano
CBDC409:	3,4-dimetil-fenil-éster del ácido 4-cloro-benzoico; compuesto con etano
CBDC410:	4-hidroxi-fenil-éster del ácido 4-cloro-benzoico; compuesto con etano
CBDC411:	4-hidroxi-fenil-éster del ácido 4-fluoro-benzoico; compuesto con etano
CBDC412:	4-fluoro-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico
CBDC413:	4-trifluorometil-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico
CBDC414:	4-hidroxi-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico
CBDC415:	4-trifluorometoxi-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico
CBDC418:	6-metil-piridín-3-il-éster del ácido 4-bromo-benzoico
CBDC440:	0-p-tolil-éster del ácido 4-bromo-tiobenzoico
CBDC441:	p-tolil-éster del ácido 4-bromo-ditiobenzoico
CBDC442:	S-p-tolil-éster del ácido 4-bromo-tiobenzoico

Las estructuras de dichos compuestos se proporcionan en la presente memoria en las figuras 3, 4, 5 y 6, y en las reivindicaciones.

45 La invención proporciona composiciones que anulan selectivamente el punto de control del ciclo celular inducido por

daños en el ADN. En una forma de realización, el compuesto CBDC402 anula selectivamente el punto de control G2 del ciclo celular inducido por daños en el ADN en células cancerosas defectivas en el punto de control G1, tal como se describe posteriormente, en el Ejemplo 1. El tratamiento de células Jurkat (línea celular derivada de leucemia de células T humanas) con bleomicina, un agente que provoca daños en el ADN utilizado como agente anticanceroso, resultó en la acumulación de células en la etapa G2/M, indicando que se había producido la detención del ciclo celular en G2 debido a daños en el ADN inducidos por la bleomicina. El compuesto CBDC402 anuló la acumulación de células inducida por bleomicina en G2/M de una manera dependiente de la dosis (figura 1). La colchicina no indujo la detención del ciclo celular en G2, y en otra forma de realización, CBDC402 no inhibió la acumulación de células inducida por colchicina en la etapa celular G2/M a ninguna de las concentraciones de CBDC402 (figura 2). De esta manera, CBDC402 anula selectivamente el punto de control del ciclo celular inducido por daños en el ADN.

La invención proporciona composiciones que anulan el punto de control G2 inducido por daños en el ADN al administrarlas en una célula. En diversas formas de realización, los compuestos CBDC004, CBDC402, CBDC403, CBDC404, CBDC405, CBDC406, CBDC407, CBDC408, CBDC409, CBDC410 y CBDC411, anularon el punto de control del ciclo celular en G2 en células Jurkat tratadas con bleomicina de una manera dependiente de la dosis (figura 3a). Una curva de dosis-respuesta para la anulación del punto de control G2 por parte de diversos compuestos CBDC demostró que CBDC402 mostraba la actividad más alta en la presente forma de realización, y todos los compuestos CBDC sometidos a ensayo podían anular el punto de control del ciclo celular en G2 a la concentración más alta (50 µg/ml). Las estructuras correspondientes a diferentes niveles de actividad se muestran en la figura 3b; la denominación CBDC correspondiente a las estructuras dadas a conocer en la figura 3b puede encontrarse haciendo referencia a la figura 4.

El método proporciona composiciones con diferentes actividades de anulación del punto de control G2. En las formas de realización adicionales, se sometieron a ensayo compuestos CBDC para su actividad de anulación del punto de control G2. Los compuestos CBDC se clasificaron como altamente activos, moderadamente activos, activos, débilmente activos e inactivos, tal como se muestra en la figura 5. La IC₅₀ de la anulación del punto de control G2 en células Jurkat se determinó mediante estudios de dosis-respuesta realizada tal como se ha descrito anteriormente para la actividad y se clasificaron según su actividad, tal como se muestra en la figura 6. En las figuras 5 y 6, los compuestos CBDC se dan a conocer totalmente mediante exposición de sus estructuras químicas, y en algunas entradas, los compuestos CBDC se identifican adicionalmente mediante un número de denominación CBDC.

La invención proporciona unas composiciones que anulan el punto de control G2 inducido por daños en el ADN inducido por una diversidad de agentes que dañan el ADN. En una forma de realización, el compuesto CBDC004 anuló el punto de control G2 inducido por daños en el ADN activado por diversos agentes anticancerosos. Se trataron células de cáncer humanas (células de carcinoma de colon humano HCT116) con bleomicina, adriamicina, camptotecina o cisplatino (CDDP), con o sin compuesto CBDC004. Cada uno de dichos agentes anticancerosos indujo una acumulación de células en G2/M del ciclo celular, y la coincubación con CBDC004 redujo el número de células en G2/M, indicando que CBDC004 había anulado el punto de control G2 inducido por daños en el ADN activado por bleomicina, adriamicina, camptotecina o cisplatino.

La invención proporciona composiciones y métodos *in vitro* para sensibilizar células frente a los tratamientos que provocan daños en el ADN. En todavía otra forma de realización, CBDC004 sensibilizó células humanas frente a los efectos citotóxicos de diversos tratamientos que provocan daños en el ADN que se utilizan como agentes anticancerosos. Las células de cáncer humano (células HCT116) se trataron con bleomicina, adriamicina, camptotecina o cisplatino, con o sin CBDC004, y se realizó un recuento del número de células muertas tras el tratamiento. El compuesto CBDC004 sensibilizó las células frente a los efectos citotóxicos de cada tratamiento que provoca daños en el ADN (figura 8). La administración de compuestos de la presente invención en células sensibiliza las células frente a los tratamientos que provocan daños en el ADN, de manera que los tratamientos que provocan daños en el ADN resultan más efectivos.

La invención proporciona composiciones y métodos *in vitro* para inhibir el crecimiento de tumores xenoinjertados. En otra forma de realización, CBDC402 inhibió el crecimiento de tumores xenoinjertados. Tras la implantación subcutánea de células de carcinoma de colon humano HCT-116 en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), se administraron diversos compuestos y se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral. El compuesto CBDC402 por sí solo proporcionó una ligera reducción del crecimiento tumoral, y las combinaciones de CBDC402 más CPT-11 (CAMPTOSAR[®], irinotecán, un inhibidor de la topoisomerasa) redujeron o inhibieron significativamente el crecimiento tumoral.

La invención proporciona composiciones y métodos *in vitro* para tratar células con trastornos proliferativos. En particular, la invención proporciona compuestos y métodos *in vitro* para inhibir diversos aspectos de células que presentan trastornos proliferativos, incluyendo la inhibición de la formación de colonias por parte de células cancerosas *in vitro*. Los compuestos de la invención inhibieron la formación de colonias por parte de células cancerosas *in vitro*, solas o en combinación con un agente anticanceroso. En una forma de realización, las células MK-45 de una línea celular derivada de cáncer gástrico humano, sembradas en placas multipocillo, se trataron con CBDC402, CBDC412, CBDC413 y CBDC418. El tratamiento con CBDC402 solo provocó una supresión significativa de la

formación de colonias por parte de las células MK-45, y el tratamiento con CBDC412 provocó una ligera supresión de la formación de colonias. En una forma de realización que también incluía CPT-11, la adición de CBDC402 aparentemente potenció el efecto de CPT-11, resultando en la supresión prácticamente completa de la formación de colonias.

La invención proporciona composiciones y métodos *in vitro* para anular selectivamente el punto de control G2 inducido por daños en el ADN, sin afectar al punto de control M. En una forma de realización, CBDC402 anula selectivamente el punto de control G2 inducido por daños en el ADN. La bleomicina indujo un incremento moderado de la acumulación de las células T normales activadas en la etapa G2 (figura 10a) e indujo una gran acumulación de células en células Jurkat (células T leucémicas) en la etapa G2 (figura 10b). El compuesto CBDC anuló el incremento inducido por bleomicina de células en la etapa G2 en ambas líneas celulares (figura 10a,b). Al tratar células T normales activadas con colchicina, se produjo una acumulación de las células en la etapa M, y CBDC402 no afectó al incremento inducido por colchicina de las células T normales activadas en la etapa M. Esta forma de realización demuestra que CBDC402 anula selectivamente el punto de control G2 del ciclo celular y no el punto de control en la etapa M.

También se describen unos métodos para sintetizar compuestos de la invención. El compuesto CBDC412 (4-fluorofenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico) puede sintetizarse tal como se indica a continuación. Se añadieron diez ml de dioxano, 5 mmoles (1,1 g) de cloruro de ácido 4-bromo-benzoico y 5 mmoles (0,56 g) de 4-fluorofenol a un matraz de cuatro bocas de 50 ml secuencialmente y se disolvieron a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota lentamente trietilamina disuelta en dioxano a dicha solución y se agitó durante tres horas a temperatura ambiente. Los cristales precipitados se filtraron y se extrajeron con benceno. La solución extraída se lavó con hidrogenocarbonato sódico varias veces, se añadió anhídrido de magnesio y la solución resultante se secó y se filtró. La solución se destiló bajo presión reducida y se cristalizó. Los cristales crudos eran de color amarillento-blanco y pesaban 1,37 g. Se disolvió una parte de este cristal (0,5 g) en benceno y se purificó con 100 g de gel de sílice. El producto purificado era blanco y se confirmó que la pureza era de 99,93% mediante cromatografía líquida (LC). Se confirmó la estructura mediante RMN (ver el Ejemplo 6).

Dianas

Entre los sujetos apropiados para el tratamiento se incluyen aquellos actualmente sometidos a tratamiento, o que son candidatos para el tratamiento, de un trastorno proliferativo o de la diferenciación (por ejemplo la terapia antitumoral). Entre los sujetos candidatos adicionales se incluyen, por ejemplo, sujetos que presentan un riesgo de desarrollar un trastorno proliferativo celular. Por lo tanto, los compuestos de la invención son aplicables al tratamiento de un sujeto que presenta un riesgo de desarrollar un trastorno proliferativo celular pero que todavía no ha manifestado síntomas externos del trastorno. Los sujetos que presentan un riesgo pueden identificarse al presentar una predisposición genética o historia familiar de desarrollo de un trastorno proliferativo celular. Por ejemplo, los sujetos que presentan un oncogén activado o que presentan una mutación o delección de un gen supresor tumoral son sujetos candidatos. Por lo tanto, los sujetos con riesgo pueden identificarse utilizando el cribado genético rutinario para la presencia de la lesión genética, o la búsqueda en la historia familiar del sujeto para establecer que presentan un riesgo de sufrir el trastorno. Un ejemplo particular de un sujeto con riesgo sería uno con una historia familiar u otra característica genética que indique predisposición a un cáncer en el que las células neoplásicas o neoplásicas resistentes a fármaco expresan CD40. Un ejemplo específico particular de una enfermedad genética es el retinoblastoma, que está causado por un defecto en el gen supresor tumoral Rb.

Típicamente, se administra una "cantidad efectiva" o "cantidad suficiente" de un compuesto de la invención, que es una cantidad suficiente para producir el efecto deseado. Por lo tanto, las cantidades efectivas se determinan mediante la medición de uno o más de entre: reducción de la proliferación celular, reducción del número de células, inhibición de una proliferación incrementada, inhibición del incremento del número de células, incremento de la apoptosis o reducción de la supervivencia de por lo menos una parte de las células que comprenden las células proliferantes (por ejemplo por lo menos algunas de las células diana). De esta manera, por ejemplo, en el caso de que se desee inhibir la proliferación celular, una cantidad efectiva será una cantidad que reduzca detectablemente la proliferación celular o el número de células proliferantes, o que incrementa la apoptosis celular o reduzca la supervivencia celular. Por lo tanto, la cantidad puede resultar suficiente para reducir el número de células diana, para estabilizar el número de células diana o para inhibir incrementos del número de células diana. Por ejemplo, en el caso de que el trastorno comprenda un tumor sólido, la reducción del tamaño tumoral, la estabilización del tamaño tumoral o la prevención del crecimiento adicional del tumor, de por lo menos una parte del tumor (por ejemplo inhibición del crecimiento de 5% a 10% de las células o de 10% a 20% o más de las células que comprende la masa tumoral) es un criterio de valoración clínica satisfactorio. En el caso de que el trastorno comprenda un tumor líquido, la reducción del número de células tumorales, la estabilización del número de células tumorales o la inhibición de incrementos adicionales del número de células tumorales de por lo menos una subpoblación de las células tumorales (por ejemplo la inhibición del crecimiento de 5% a 10% de las células o de 10% a 20% o más de las células) es un criterio de valoración clínica satisfactorio.

Además, las cantidades consideradas efectivas pueden evitar o inhibir el avance del estado o trastorno. Por ejemplo, determinados tumores a medida que progresan incrementan su agresividad, incluyendo la progresión hasta formas

metastásicas. De esta manera, las cantidades también consideradas efectivas resultarían en la reducción o prevención de que los tumores incrementen su agresividad o metastaticen. De acuerdo con lo anterior, la inhibición o prevención de un agravamiento del trastorno o estado, es decir, la estabilización del estado, es un criterio de valoración clínica satisfactorio adicional.

5 El examen de una muestra biológica que contiene un tumor líquido (por ejemplo sangre o una muestra de tejido) puede establecer si se ha reducido la masa o número de células tumorales, o si se ha producido la inhibición de la proliferación de las células tumorales. En el caso de un tumor sólido, los métodos de obtención de imágenes invasivos y no invasivos pueden determinar si se ha producido una reducción del tamaño tumoral, o la inhibición de incrementos del tamaño tumoral. La reducción del recuento de un receptor de un tumor positivo para un receptor puede utilizarse para evaluar la reducción o inhibición de la proliferación de células tumorales. Pueden utilizarse las cantidades de hormona de un tumor productor de hormona, por ejemplo cánceres mamarios, testiculares u ováricos, para evaluar una reducción o inhibición de la proliferación del tumor.

15 Las cantidades efectivas también pueden reducir o disminuir objetiva o subjetivamente la gravedad o frecuencia de los síntomas asociados al trastorno o estado. Por ejemplo, una cantidad de un compuesto de la invención que reduzca el dolor, náusea u otra incomodidad, o que incremente el apetito o bienestar subjetivo es un criterio de valoración clínica satisfactorio.

20 Entre las cantidades efectivas también se incluye una reducción de la cantidad (por ejemplo dosis) o frecuencia de tratamiento con otro protocolo, que se considera un criterio de valoración clínica satisfactorio. Por ejemplo, un paciente de cáncer tratado con un compuesto de la invención puede requerir una menor cantidad de agente que produzca daños en los ácidos nucleicos administrado en el sujeto en comparación con la frecuencia o cantidad de dosis administrada sin tratamiento con un compuesto de la invención.

25 Los métodos de la invención que conducen a una mejora del estado del sujeto o a un beneficio terapéutico pueden presentar una duración relativamente corta, por ejemplo la mejora puede durar varias horas, días o semanas, o extenderse a lo largo de un periodo de tiempo más prolongado, por ejemplo meses o años. Una cantidad efectiva puede no ser una eliminación completa de cualquiera o la totalidad de los síntomas del estado o trastorno. De esta manera, un criterio de valoración clínica satisfactorio para una cantidad efectiva se consigue en el caso de que se produzca una mejora subjetiva u objetiva en el estado del sujeto según se determine utilizando cualquiera de los criterios anteriormente indicados u otros criterios conocidos en la técnica apropiados para determinar la situación del trastorno o estado, a lo largo de un periodo de tiempo corto o largo. Una cantidad efectiva para proporcionar uno o más efectos beneficiosos, tal como se describe en la presente memoria o es conocido en la técnica, se denomina "mejora" del estado del sujeto o "beneficio terapéutico" para el sujeto.

35 Una cantidad efectiva de un compuesto de la invención puede determinarse basándose en estudios animales u opcionalmente en ensayos clínicos humanos. El experto en la materia apreciará que diversos factores pueden influir sobre la dosis y el régimen requeridos para tratar un sujeto particular, incluyendo, por ejemplo, la salud general, edad o género del sujeto, la gravedad o estadio del trastorno o estado, los tratamientos anteriores, la susceptibilidad frente a efectos secundarios no deseables, el resultado clínico deseado y la presencia de otros trastornos y estados. Dichos factores pueden influir sobre la dosis y régimen requerido para proporcionar una cantidad suficiente para producir un beneficio terapéutico. El régimen de dosificación considera asimismo la farmacocinética, es decir, la tasa de absorción de la composición farmacéutica, la biodisponibilidad, el metabolismo y la eliminación. Además, las dosis o protocolos de tratamiento pueden adaptarse específicamente al sujeto o modificarse basándose en datos farmacogenómicos.

40 Las células que pueden tratarse con los compuestos de la invención incluyen cualquier célula cuya proliferación se desee inhibir o prevenir *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Determinadas células diana muestran un tiempo de punto de control G1 del ciclo celular más corto de lo normal, o presentan un punto de control G1 del ciclo celular alterado, de manera que las células salen del punto de control G1 antes de que haya transcurrido suficiente tiempo para completar la reparación de los ácidos nucleicos. Las células candidatas también pueden identificarse mediante la puesta en contacto de una célula de ensayo con un compuesto de la invención solo o en combinación con un tratamiento que daña el ADN, y la determinación de si la célula contactada muestra una proliferación reducida o una muerte celular incrementada, en particular apoptosis o catástrofe mitótica.

50 Por lo tanto, los compuestos de la invención resultan útiles para inhibir la proliferación celular *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. De esta manera, los sujetos que presentan, o con riesgo de presentar, un trastorno o estado fisiológico caracterizado por una proliferación o supervivencia celular anormal o no deseable o no deseada, o una diferenciación celular anormal o deficiente, pueden tratarse con un compuesto de la invención solo o en combinación con un tratamiento que provoque directa o indirectamente daños en el ADN, o en combinación con un tratamiento antiproliferativo.

60 De esta manera, según la invención, se proporcionan unos métodos para inhibir la proliferación celular, métodos para incrementar la sensibilidad de una célula frente a un agente o tratamiento que daña el ADN y métodos para incrementar los daños en ácidos nucleicos en una célula *in vitro*. En una forma de realización, un método incluye

poner en contacto una célula (por ejemplo una célula en cultivo o una célula presente en un sujeto) con una cantidad de compuesto de la invención suficiente para anular el punto de control G2. En otra forma de realización, un método incluye poner en contacto la célula con una cantidad de un compuesto de la invención suficiente para incrementar la sensibilidad de la célula frente a un agente o tratamiento que daña el ADN. En todavía otra forma de realización, un método incluye poner en contacto una célula con una cantidad de un compuesto de la invención que resulta suficiente para incrementar los daños en los ácidos nucleicos de la célula. En diversos aspectos, un método incluye además poner en contacto la célula con un agente que daña el ADN o exponer la célula a un tratamiento que daña el ADN.

Se proporcionan además compuestos para la utilización en el tratamiento de un trastorno de la proliferación celular en un sujeto, incluyendo los estados caracterizados por la proliferación celular o supervivencia celular no deseables o no deseadas, condiciones caracterizadas por la apoptosis deficiente o aberrante, o estados caracterizados por la supervivencia celular aberrante o deficiente. En una forma de realización, los compuestos se administran en un sujeto que presenta, o con riesgo de presentar, un trastorno proliferativo celular en una cantidad que resulta efectiva para tratar el trastorno proliferativo celular. En un aspecto, la cantidad resulta suficiente para mejorar el estado del sujeto. En aspectos particulares, la mejora incluye, en por lo menos una parte de las células diana (por ejemplo células anormalmente proliferantes), una proliferación celular reducida, un número reducido de células, la inhibición de incrementos del número de células, apoptosis incrementada o supervivencia reducida. En todavía otro aspecto, se administra un compuesto de la invención en un sujeto antes, durante o después de la administración de un tratamiento que inhibe la proliferación celular. En aspectos particulares adicionales, por lo menos una parte de las células del trastorno proliferativo celular se encuentran situadas en sangre, mama, pulmón, tiroides, cabeza o cuello, cerebro, linfa, tracto gastrointestinal, tracto genitourinario, riñón, páncreas, hígado, hueso, músculo o piel.

En otra forma de realización, una cantidad de un compuesto de la invención se administra en un sujeto con el fin de tratar un tumor sólido. En todavía otra forma de realización, una cantidad de un compuesto de la invención se administra en el sujeto con el fin de tratar un tumor líquido. En diversos aspectos, el sujeto que presenta el tumor recibe la administración de un compuesto de la invención antes, durante o después de otra terapia antitumoral.

Utilización de los compuestos de la invención para tratar trastornos proliferativos

Entre los trastornos proliferativos que pueden tratarse utilizando composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria se incluyen enfermedades y estados fisiológicos no patológicos, tanto benignos como neoplásicos, caracterizados por un número celular, crecimiento celular o supervivencia celular anormales o no deseables. Por lo tanto, dichos trastornos o estados constituyen un estado de enfermedad e incluyen todos los tipos de crecimiento canceroso o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados malignamente, o pueden ser no patológicos, es decir, una desviación de la normalidad pero que no se asocia típicamente a la enfermedad. Un ejemplo específico de un estado no patológico que puede tratarse según la invención es el crecimiento nuevo del tejido durante la cicatrización de heridas, que resulta en cicatrización.

Las células que comprenden el trastorno proliferativo pueden agregarse en una masa celular o encontrarse dispersadas. La expresión "tumor sólido" se refiere a neoplasias o metástasis que típicamente se agregan entre sí y forman una masa. Entre los ejemplos particulares se incluyen tumores viscerales tales como cáncer gástrico o de colon, hepatomas, carcinomas renales, tumores/cánceres pulmonar y cerebral. Un "tumor líquido" se refiere a neoplasias del sistema hematopoyético, tal como linfomas, mielomas y leucemias, o neoplasias que son de naturaleza difusa, debido a que típicamente no forman una masa sólida. Entre los ejemplos particulares de leucemias se incluyen el mieloma linfoblástico, mieloblástico y múltiple agudo y crónico.

Entre dichos trastornos se incluyen los neoplasmas o los cánceres, que pueden afectar virtualmente a cualquier célula o tipo de tejido, por ejemplo carcinoma, sarcoma, melanoma, trastornos metastásicos o trastornos neoplásicos hematopoyéticos. Un tumor metastásico puede surgir de una multitud de tipos tumorales primarios, que comprenden de manera no limitativa, mama, pulmón, tiroides, cabeza y cuello, cerebro, linfoide, gastrointestinal (boca, esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto), tracto genitourinario (útero, ovario, cérvix, vejiga, testículo, pene, próstata), riñón, páncreas, hígado, hueso, músculo y piel.

Los carcinomas se refieren a malignidades del tejido epitelial o endocrino, e incluyen carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas prostáticos, carcinomas del sistema endocrino y melanomas. Los carcinomas ejemplificativos comprenden los formados a partir del cérvix, pulmón, próstata, mama, cabeza y cuello, colon, hígado y ovario. La expresión también incluye carcinosarcomas, por ejemplo, que incluyen tumores malignos compuestos de tejidos carcinomatosos y sarcomatosos. El adenocarcinoma incluye un carcinoma de un tejido glandular, o en el que el tumor forma una estructura de tipo glandular.

Los sarcomas se refieren a tumores malignos de origen celular mesenquimal. Entre los sarcomas ejemplares se incluyen, por ejemplo, el linfosarcoma, el liposarcoma, el osteosarcoma y el fibrosarcoma.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "trastorno proliferativo hematopoyético" se refiere a una

enfermedad que implica células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, por ejemplo que surgen de los linajes mieloide, linfoide o eritroide, o las células precursoras de las mismas. Típicamente, la enfermedad aparece a partir de leucemias agudas poco diferenciadas, por ejemplo de leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Los trastornos mieloides ejemplificativos adicionales comprenden, de manera no limitativa, la leucemia promieloide aguda (APML), la leucemia mielógena aguda (AML) y la leucemia mielógena crónica (CML); entre las malignidades linfoides se incluyen, aunque sin limitación, la leucemia linfoblástica aguda (ALL), que incluye el linaje B ALL y el linaje T ALL, la leucemia linfocítica crónica (CLL), la leucemia prolinfocítica (PLL), la leucemia de células pilosas (HLL) y la macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). Los linfomas malignos adicionales comprenden de manera no limitativa, el linfoma no de Hodgkin y variantes del mismo, linfomas de células T periféricas, leucemia/linfoma de células T adultas (ATL), linfoma cutáneo de células T (CTCL), leucemia linfocítica granular de células grandes (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg.

Los tratamientos para la utilización en combinación con compuestos de la invención comprenden cualquier tratamiento antiproliferativo, que provoca daños en el ADN, o antitumoral tal como se da a conocer en la presente memoria o que es conocido en la técnica. Por ejemplo, un tratamiento antiproliferativo celular o antitumoral puede comprender un tratamiento de radiación o la resección quirúrgica, opcionalmente en combinación con el tratamiento farmacológico. El tratamiento puede comprender la administración de una sustancia química, tal como un isótopo radioactivo, un fármaco, tal como un agente quimioterapéutico, o la terapia genética, tal como un antioncogén (por ejemplo Rb, DCC y p53), un oncogén negativo dominante o un oligonucleótido antisentido contra un oncogén. Los compuestos pueden administrarse antes, durante o después de otros protocolos de tratamiento. Por ejemplo, un sujeto candidato para la terapia antiproliferativa celular (por ejemplo terapia de radiación, quimioterapia, terapia génica o resección quirúrgica) puede recibir la administración de un compuesto de la invención antes de iniciar la terapia antiproliferativa celular. De esta manera, se proporcionan métodos de tratamiento profiláctico.

25 *Bibliotecas químicas combinatoriales*

Las bibliotecas químicas combinatoriales son unos medios para asistir en la generación de nuevos compuestos químicos cabeza de serie, es decir, compuestos que inhiben o anulan el punto de control del ciclo celular de detención en G2. Una biblioteca química combinatorial es una colección de diversos compuestos químicos generados mediante síntesis química o síntesis biológica mediante la combinación de varios "bloques constructivos" químicos, tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatorial lineal, tal como una biblioteca de polipéptidos, se forma mediante la combinación de un conjunto de bloques constructivos químicos denominados aminoácidos de todas las maneras posibles para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipéptido). Pueden sintetizarse millones de compuestos químicos mediante dicha mezcla combinatorial de bloques constructivos químicos. Por ejemplo, la mezcla combinatorial sistemática de 100 bloques constructivos químicos intercambiables resulta en la síntesis teóricamente de 100 millones de compuestos tetraméricos o de 10.000 millones de compuestos pentaméricos. La preparación y cribado de bibliotecas químicas combinatoriales son bien conocidos por el experto en la materia; ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.004.617 y nº 5.985.356. Dichas bibliotecas químicas combinatoriales comprenden de manera no limitativa, bibliotecas de péptidos (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.010.175; Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37:487-493, (1991); Houghton *et al.*, *Nature* 354:84-88, (1991)). Otras reacciones para generar bibliotecas de diversidad química comprenden de manera no limitativa, peptoides (ver, por ejemplo, el documento WO 91/19735), péptidos codificados (ver, por ejemplo, el documento WO 93/20242), biooligómeros aleatorios (ver, por ejemplo, el documento WO 92/00091), las benzodiazepinas (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (ver, por ejemplo, Hobbs, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:6909-6913, (1993)), polipéptidos vinillogos (ver, por ejemplo, Hagihara, *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568, (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con un andamiaje de beta-D-glucosas (ver, por ejemplo, Hirschmann, *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9217-9218, (1992)), síntesis orgánicas análogas de bibliotecas de compuestos de tamaño reducido (ver, por ejemplo, Chen, *J. Amer. Chem. Soc.* 116:2661, (1994)), oligocarbamatos (ver, por ejemplo, Cho, *Science* 261:1303, (1993)) y/o fosfonatos de peptidilo (ver, por ejemplo, Campbell, *J. Org. Chem.* 59:658, (1994)). Ver también Gordon, *J. Med. Chem.* 37:1385, (1994); para las bibliotecas de ácidos nucleicos, bibliotecas de péptidos-ácidos nucleicos ver, por ejemplo, la patente US nº 5.539.083; para las bibliotecas de anticuerpos ver, por ejemplo, Vaughn, *Nature Biotechnology* 14:309-314, (1996); para las bibliotecas de carbohidratos, ver, por ejemplo, Liang *et al.*, *Science* 274:1520-1522, (1996), patente US nº 5.593.853; para bibliotecas de moléculas orgánicas de tamaño reducido ver, por ejemplo, para los isoprenoides, la patente US nº 5.569.588; para tiazolidinonas y metatiazanonas, la patente US nº 5.549.974; para las pirrolidinas, las patentes US nº 5.525.735 y nº 5.519.134; para los compuestos morfolino, la patente US nº 5.506.337; para las benzodiazepinas, la patente US nº 5.288.514.

Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatoriales se encuentran comercializados (ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.045.755, nº 5.792.431; 357 MPS, 390 MPS, *Advanced Chem. Tech.*, Louisville KY, *Symphony*, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA). También se han desarrollado varios sistemas robóticos para reacciones en fase solución. Estos sistemas comprenden estaciones de trabajo automatizadas, por ejemplo como el aparato de síntesis automática desarrollado por Takeda Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japón) y muchos sistemas robóticos que utilizan brazos robóticos (Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett Packard, Palo Alto, Calif.) que imitan las operaciones sintéticas manuales realizadas por un químico. Cualquier de los dispositivos mencionados anteriormente resulta adecuado

para la utilización con la presente invención. La naturaleza e implementación de modificaciones en estos dispositivos (en caso de realizarse alguna) de manera que puedan operar tal como se comenta en la presente memoria resultarán evidentes para los expertos en la materia. Además, numerosas bibliotecas combinatoriales se encuentran disponibles comercialmente (ver, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscow, Ru; Tripos, Inc., St. Louis, MO; ChemStar, Ltd., Moscow, RU; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia, MD, etc.).

Formulación y administración de composiciones farmacéuticas

En una forma de realización, se combinan los compuestos de la invención con un portador (excipiente) farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacológica. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden contener un compuesto fisiológicamente aceptable que actúa, por ejemplo, estabilizando, incrementando o reduciendo las tasas de absorción o eliminación de las composiciones farmacéuticas de la invención. Los compuestos fisiológicamente aceptables pueden comprender, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular, composiciones que reducen la eliminación o hidrólisis de los compuestos, o excipientes u otros estabilizadores y/o tampones. También pueden utilizarse detergentes para estabilizar o para incrementar o reducir la absorción de la composición farmacéutica, incluyendo portadores liposómicos. Los portadores farmacéuticamente aceptables y las formulaciones de compuestos tal como se dan a conocer en la presente memoria son conocidas por el experto en la materia y se describen en detalle en la literatura científica y de patentes; ver, por ejemplo, la última edición de Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania ("Remington's").

Otros compuestos fisiológicamente aceptables comprenden agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes o conservantes que resultan particularmente útiles para prevenir el crecimiento o la acción de los microorganismos. Son bien conocidos diversos conservantes y comprenden, por ejemplo, el fenol y el ácido ascórbico. El experto en la materia apreciará que la elección de un portador farmacéuticamente aceptable, incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de la vía de administración del compuesto de la invención y de sus características físicoquímicas particulares.

En una forma de realización, se disuelve una solución de por lo menos un compuesto de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo un portador acuoso en el caso de que la composición sea soluble en agua. Entre los ejemplos de soluciones acuosas que pueden utilizarse en formulaciones para la administración entérica, parenteral o transmucosal de fármacos se incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución de Hank, solución de Ringer, dextrosa/solución salina, soluciones de glucosa. Las formulaciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según resulte necesario para aproximarse a los estados fisiológicos, tales como agentes tamponadores, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y detergentes. Entre los aditivos también pueden incluirse principios activos adicionales, tales como agentes bactericidas o estabilizadores. Por ejemplo, la solución puede contener acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, monolaurato de sorbitán u oleato de trietanolamina. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, o pueden esterilizarse mediante filtración. Las soluciones acuosas resultantes pueden empaquetarse para la utilización sin modificación, o liofilizarse, combinando la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de la administración. La concentración del péptido en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se selecciona principalmente basándose en volúmenes fluidos, viscosidades, peso corporal según el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente.

Pueden utilizarse formulaciones sólidas para la administración entérica (oral). Pueden formularse en forma de, por ejemplo, píldoras, comprimidos, polvos o cápsulas. Para las composiciones sólidas, pueden utilizarse portadores sólidos no tóxicos convencionales, incluyendo, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. Para la administración oral, se forma una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable mediante la incorporación de cualquiera de los excipientes utilizados normalmente, tales como los portadores anteriormente listados, y generalmente 10% a 95% de principio activo (por ejemplo un péptido). También puede utilizarse una formulación no sólida para la administración entérica. El portador puede seleccionarse de entre diversos aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los excipientes farmacéuticos adecuados comprenden, por ejemplo, almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato sódico, monoestearato de glicerol, cloruro sódico, leche desnatada seca, glicerol, propilenglicol, agua y etanol.

Los compuestos de la invención, administrados por vía oral, pueden protegerse de la digestión. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante acomplejamiento del compuesto o compuestos con una composición que lo convierta en resistente a la hidrólisis ácida y enzimática o mediante empaquetamiento del péptido o complejo en un portador apropiadamente resistente, tal como un liposoma. Los medios de protección de compuestos frente a la digestión son bien conocidos en la técnica, ver, por ejemplo, Fix, Pharm. Res. 13:1760-1764, (1996); Samanen, J. Pharm. Pharmacol. 48:119-135, (1996); la patente US nº 5.391.377, que describe composiciones de lípidos para la

administración oral de agentes terapéuticos (la administración liposómica se expone con mayor detalle posteriormente).

5 La administración sistémica también puede llevarse a cabo por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, pueden utilizarse en la formulación penetrantes apropiados a la barrera que debe permearse. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, y comprenden, por ejemplo para la administración transmucosal, sales biliares y derivados del ácido fusídico. Además, pueden utilizarse 10 detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosal puede realizarse mediante pulverizadores nasales o utilizando supositorios. Ver, por ejemplo, Sayani, "Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae", Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 13:85-184, (1996). Para la administración transdérmica tópica, los agentes se formulan en pomadas, cremas, ungüentos, polvos y geles. Los sistemas de administración transdérmica pueden asimismo comprender, por ejemplo, parches.

15 Los compuestos de la invención también pueden administrarse en mecanismos de administración o liberación sostenida, que pueden administrar la formulación internamente. Por ejemplo, pueden incluirse en las formulaciones de la invención microesferas o cápsulas biodegradables u otras configuraciones de polímero biodegradable que pueden administrar sostenidamente un compuesto tal como se da a conocer en la presente memoria (ver, por ejemplo, Putney, Nat. Biotechnol. 16:153-157, (1998)).

20 Para la inhalación, pueden administrarse los compuestos de la invención utilizando cualquier sistema conocido en la técnica, incluyendo aerosoles de polvos secos, sistemas de administración de líquidos, nebulizadores de chorro de aire y sistemas propelentes. Por ejemplo, la formulación farmacéutica puede administrarse en forma de un aerosol o niebla. Para la administración de aerosol, la formulación puede suministrarse en forma finamente dividida conjuntamente con un surfactante y propelente. En otra forma de realización, el dispositivo para administrar la 25 formulación en tejido respiratorio es un inhalador en que se vaporiza la formulación. Otros sistemas de administración de líquidos comprenden, por ejemplo, nebulizadores de chorro de aire.

30 Durante la preparación de los productos farmacéuticos de la presente invención, puede utilizarse una diversidad de modificaciones de formulación y manipularse para alterar la farmacocinética y la distribución biológica. El experto ordinario en la materia conocerá varios métodos para alterar la farmacocinética y distribución biológica. Entre los ejemplos de dichos métodos se incluyen la protección de los complejos en vesículas compuestas de sustancias tales como proteínas, lípidos (por ejemplo liposomas, ver posteriormente), carbohidratos o polímeros sintéticos (comentados anteriormente). Para un comentario general de la farmacocinética, ver, por ejemplo, Remington's, 35 capítulos 37 a 39.

40 Los compuestos y composiciones en la invención pueden administrarse solas o en forma de composiciones farmacéuticas mediante cualesquier medios conocidos en la técnica, por ejemplo sistémicamente, regionalmente o localmente (por ejemplo directamente en un tumor o dirigidamente al mismo); mediante administración intraarterial, intratecal (IT), intravenosa (IV), parenteral, en la cavidad intrapleural, tópica, oral o local; por vía subcutánea, intratraqueal (por ejemplo mediante aerosol) o transmucosal (por ejemplo en la mucosa bucal, de la vejiga, vaginal, 45 uterina, rectal o nasal). Los métodos actuales para preparar composiciones administrables parenteralmente resultarán conocidos o evidentes para el experto en la materia y se describen en detalle en, por ejemplo, Remington's. Para un "efecto regional", por ejemplo, para concentrarse en un órgano específico, un modo de administración comprende las inyecciones intraarteriales o intratecales (IT) por ejemplo, para concentrarse en un órgano específico, por ejemplo cerebro y SNC (ver por ejemplo, Gurun (1997) Anesth Analg. 85:317-323). Por ejemplo, la inyección intracarotídea resulta preferida cuando se desea suministrar un complejo de polipéptido o péptido directamente al cerebro. La administración parenteral resulta una vía preferida de suministro si resulta necesaria una dosificación sistémica elevada. Los procedimientos actuales para la preparación de las composiciones que se pueden administrar parenteralmente serán conocidos o resultarán evidentes para el experto 50 en la materia y son descritos en detalle en por ejemplo, Remington's. Ver también Bai, J. Neuroimmunol. 80:65-75, (1997); Warren, J. Neurol. Sci. 152:31-38, (1997); Tonegawa, J. Exp. Med. 186:507-515, (1997).

55 En una forma de realización, las formulaciones farmacéuticas que comprenden compuestos de la invención se incorporan en monocapas o bicapas lipídicas, por ejemplo liposomas; ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.110.490, nº 6.096.716, nº 5.283.185 y nº 5.279.833. Las formulaciones liposomas pueden administrarse mediante cualquier medio, incluyendo la administración intravenosa, transdérmica (ver, por ejemplo, Vutla, J. Pharm. Sci. 85:5-8, (1996)), transmucosal u oral. La invención también proporciona preparaciones farmacéuticas en las que los péptidos y/o complejos de la invención se incorporan dentro de micelas y/o liposomas (ver, por ejemplo, Suntries, J. Pharm. Pharmacol. 46:23-28, (1994); Woodle, Pharm. Res. 9:260-265, (1992)). Los liposomas y formulaciones liposómicas pueden prepararse según métodos estándares y también son bien conocidos en la técnica; ver, por 60 ejemplo, Remington's; Akimaru, Cytokines Mol. Ther. 1:197-210, (1995); Alving, Immunol. Rev. 145:5-31, (1995); Szoka, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467, (1980); patentes US nº 4.235.871, nº 4.501.728 y nº 4.837.028.

65 Una formulación farmacéuticamente aceptable puede incorporar entre aproximadamente 1% y 99,9% de principio activo (por ejemplo un compuesto de la presente invención). Las composiciones farmacéuticas pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, o pueden esterilizarse mediante filtración. Son

conocidos en la técnica formulaciones farmacéuticas y sistemas de administración adicionales y son aplicables en métodos y composiciones de la invención (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edición, Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990); The Merck Index, 12^a edición, Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ, (1996); Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993); y Poznansky *et al.*, Drug. Delivery Systems, R.L. Juliano, editor, Oxford, N.Y., páginas 253 a 315, (1980).

Las formulaciones farmacéuticas pueden empaquetarse en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. La expresión "forma de dosificación unitaria" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a dosis unitarias físicamente discretas para la administración en el sujeto que debe tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto que produce un efecto deseado en combinación con un portador o excipiente farmacéutico.

Regímenes de tratamiento: farmacocinética

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una diversidad de formas de dosificación unitaria dependiendo del método de administración. Las dosis para las composiciones farmacéuticas típicas son bien conocidas por el experto en la materia. Dichas dosis típicamente son de naturaleza opcional y se ajustan dependiendo del contexto terapéutico particular y tolerancia del paciente. La cantidad de compuesto o compuestos de la invención que resulta adecuada para conseguir lo anterior se define como una "dosis terapéuticamente efectiva". El programa de dosificación y las cantidades efectivas para dicha utilización, es decir, el "régimen de dosificación", dependerá de una diversidad de factores, incluyendo el estadio de la enfermedad o estado, la gravedad de la enfermedad o estado, la situación general de salud del paciente, la situación física del paciente, la edad, la formulación farmacéutica y la concentración de agente activo. Durante el cálculo del régimen de dosificación para un paciente, también se considera el modo de administración. El régimen de dosificación también debe considerar la farmacocinética, es decir, la tasa de absorción, biodisponibilidad, metabolismo y eliminación de la composición farmacéutica. Ver, por ejemplo, la última edición del Remington's; Egleton, "Bioavailability and transport of peptides and peptide drugs into the brain", Peptides 18:1431-1439, (1997); Langer, Science 249:1527-1533, (1990).

En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran en un paciente que sufre de cáncer en una cantidad suficiente para detener por lo menos parcialmente la enfermedad y/o sus complicaciones. Por ejemplo, en una forma de realización, una dosis de composición farmacéutica soluble para la administración intravenosa (IV) sería de entre aproximadamente 0,01 mg/h y aproximadamente 1,0 mg/h administrados durante varias horas (típicamente 1, 3 ó 6 horas), que pueden repetirse durante semanas a ciclos intermitentes. Pueden utilizarse dosis considerablemente más altas (por ejemplo de hasta aproximadamente 10 mg/ml), particularmente en el caso de que el fármaco se administra en un sitio apartado y no en el flujo sanguíneo, tal como en una cavidad corporal o en la luz de algún órgano, por ejemplo en el líquido cerebrospinal (CSF).

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado que el apreciado comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Aunque durante la puesta en práctica o ensayo de la presente invención pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los indicados en la presente memoria, en la presente memoria se describen los métodos y materiales adecuados.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo, y no limitativo de la invención reivindicada.

Ejemplo 1: anulación selectiva del punto de control G2 del ciclo celular inducido por daños en el ADN en células defectivas en punto de control G1 (células cancerosas)

Compuestos químicos y reactivos. Se obtuvieron bleomicina, adriamicina y colchicina de Wako Pure Chemical Co. (Osaka, Japón). Estos compuestos químicos se disolvieron en H₂O destilada a una concentración de 10 mg/ml y se almacenaron a 4°C. Se obtuvo cisplatino de Nihon Kayaku Co. (Tokyo, Japón) disuelto en H₂O destilada a una concentración de 5 mg/ml y se almacenó a 4°C. Se obtuvo camptotecina (Campto) de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Se obtuvo yoduro de propidio (PI) de Sigma. Se obtuvo fitohemaglutinina de Life Technologies, Inc. (Grand Island, NY). Se obtuvo interleuquina 2 (IL-2) de Hemagen Diagnostics Inc.

Cultivo celular. Se cultivó una línea celular derivada de leucemia de células T humanas, línea Jurkat, en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con suero de feto bovino al 10% (IBL: ImmunoBiological Laboratories, Gunma, Japón) a 37°C/5% de CO₂. Se cultivó una línea celular derivada de cáncer de colon humano, HCT116, en medio de McCoy 5A modificado (Gibco BRL) y suplementado con suero de feto bovino al 10% a 37°C/5% de CO₂. Se separaron linfocitos sanguíneos periféricos humanos normales mediante Ficoll-Paque® (Pharmacia) y se cultivaron en presencia de 0,1 µg/ml de PHA y 1 µg/ml de IL-2.

Análisis del ciclo celular. Se analizó mediante citometría de flujo el estado del ciclo celular de las células tratadas con

compuestos de la invención y/o bleomicina, adriamicina, colchicina o cisplatino, esencialmente tal como se describe en Kawabe, Nature 385:454-458, (1997). Brevemente, se resuspendieron dos millones de células y se incubaron en 300 µl de solución de Krishan (citrato sódico al 0,1%, 50 µg/ml de PI, 20 µg/ml de ARNasa A y NP-40 al 0,5%) durante 1 hora a 4°C y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FACScan™ (Becton Dickinson, Mountain View, CA) con el programa CELLQuest™ (Becton Dickinson).

CBDC402 anuló la acumulación de células en la etapa G2 del ciclo celular inducida por bleomicina en células Jurkat

Se trataron células Jurkat (una línea celular derivada de leucemia de células T humanas) con bleomicina (40 µg/ml) o bleomicina más compuesto CBDC402 (p-tolil-éster del ácido 4-bromo-benzoico) a diversas concentraciones (0,2, 0,39, 0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25 y 50 µg/ml) durante 24 horas. El ADN de las células Jurkat tratadas se tiñó con yoduro de propidio y se evaluó mediante citometría de flujo el estado del ciclo celular de cada célula. Tal como se muestra en la figura 1, el tratamiento de bleomicina indujo una acumulación de células en la etapa G2/M del ciclo celular. El tratamiento de CBDC402 anuló la acumulación de células en G2/M inducida por bleomicina de una manera dependiente de la dosis.

El punto de control en la etapa M en células Jurkat no resultó anulado por el tratamiento de CBDC402

Se trataron células Jurkat con colchicina (5 µg/ml) y colchicina más el compuesto CBDC402 a diversas concentraciones (0,2, 0,39, 0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25 y 50 µg/ml) durante 24 horas. Se tiñó con yoduro de propidio el ADN de las células Jurkat tratadas y se evaluó mediante citometría de flujo el estado del ciclo celular de cada célula. Tal como se muestra en la figura 2, el tratamiento de colchicina indujo una acumulación de células en la etapa G2/M y CBDC402 no anuló esta acumulación en G2/M a ninguna concentración de CBDC402.

Diversos compuestos CBDC anularon el punto de control G2 del ciclo celular

Se trataron células Jurkat con bleomicina (40 µg/ml) y diversos compuestos CBDC a las concentraciones 0,2, 0,39, 0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25 y 50 µg/ml y se cultivaron durante 24 horas. Se sometieron a ensayo los compuestos CBDC 004, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410 y 411. Se recolectaron células, se tiñó el ADN con yoduro de propidio y se determinó el porcentaje de células en la etapa G2/M (% en G2/M) mediante citometría de flujo. La figura 3 muestra el % de células en G2/M que se detectaron para cada concentración de cada compuesto CBDC, proporcionando una curva de dosis-respuesta para la anulación del punto de control G2 por parte de diversos compuestos CBDC. El compuesto CBDC402 mostró la actividad más alta. Todos los compuestos CBDC sometidos a ensayo anularon el punto de control G2 del ciclo celular a la concentración más alta (50 µg/ml). Las estructuras de los compuestos CBDC sometidos a ensayo en este experimento se muestran en la figura 4.

Se sometieron a ensayo compuestos CBDC adicionales para su actividad de anulación del punto de control G2 tal como se ha indicado anteriormente. Tal como se muestra en la figura 5, los compuestos se clasificaron como: muy activos, moderadamente activos, activos, débilmente activos e inactivos. Tal como se muestra en la figura 6, la IC₅₀ de la anulación del punto de control G2 en células Jurkat se determinó mediante estudios de dosis-respuesta llevados a cabo tal como se ha indicado anteriormente.

El compuesto CBDC004 anuló el punto de control G2 del ciclo celular inducido por diversos agentes anticancerosos

Se trataron células de carcinoma de colon humano HCT116 con bleomicina (Bleo) a una concentración de 10 µg/ml, o con adriamicina (ADR) a una concentración de 1 µg/ml, o con camptotecina (Campto) a una concentración de 10 µg/ml, o con cisplatino (CDDP) a una concentración de 2 µg/ml, y con CBDC004 a concentraciones de 0, 2, 10 ó 50 µM, durante 24 horas. Se tiñó el ADN con yoduro de propidio y se evaluó mediante citometría de flujo el estado del ciclo celular de cada célula. Tal como se muestra en la figura 7, cada uno de dichos agentes anticancerosos indujo una acumulación de células en el G2/M del ciclo celular, y la coincubación con CBDC004 redujo el número de células en G2/M. Lo anterior indica que CBDC004 anuló el punto de control G2 activado por bleomicina, adriamicina, camptotecina o cisplatino.

Ejemplo 2: sensibilización de células cancerosas frente al tratamiento que daña el ADN

Se determinó la actividad citotóxica de tratamientos de combinación mediante el análisis de la población subG1 de células HCT116 tratadas con bleomicina, adriamicina, camptotecina o cisplatino con o sin CBDC004 a concentraciones de 2, 10 ó 50 µM. Se determinó la población subG1 mediante tinción de las HCT116 con solución de Krishan y el análisis mediante citometría de flujo. Las células muertas se identificaron basándose en el contenido de ADN, y se calculó el porcentaje de células subG1 (% subG1). Tal como se muestra en la figura 8, la bleomicina, la adriamicina, la camptotecina o el cisplatino presentaron un efecto citotóxico sobre las células HCT116 y CBDC004 incrementó las actividades citotóxicas de dichos agentes anticancerosos de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 3: el compuesto CBDC402 suprimió el crecimiento de tumores xenoinjetados en ratones SCID

Se implantaron subcutáneamente células de carcinoma de colon humano HCT-116 en ratones con

inmunodeficiencia combinada severa (SCID). Se inició el tratamiento al alcanzar los tumores primarios un tamaño de $0,1 \text{ cm}^3$ (7 u 8 mm, denominado el día 1).

Se administró agente anticanceroso CPT-11 (CAMPTOSAR[®], irinotecán, un inhibidor de la topoisomerasa) y CBDC402 mediante inyección intraperitoneal en los regímenes de tratamiento siguientes: CPT-11 a una dosis de 20 mg/kg una vez a la semana; CBDC402 a una dosis de 20 mg/kg dos veces a la semana; CBDC402 a una dosis de 40 mg/kg dos veces a la semana; CBDC402 a una dosis de 20 mg/kg dos veces a la semana más CPT-11 a una dosis de 20 mg/kg una vez a la semana; y CBDC402 a una dosis de 40 mg/kg dos veces a la semana más CPT-11 a una dosis de 20 mg/kg una vez a la semana. Se administró DMSO como tratamiento de control. Se midieron los tamaños tumorales utilizando un calibrador tres veces a la semana, y se calculó el volumen utilizando la fórmula siguiente: peso (mg)=[anchura (mm)² x longitud (mm)]/2. Los tamaños tumorales medios para cada grupo de tratamiento (n=4) se representaron en un gráfico frente a los días de tratamiento. Tal como se muestra en la figura 9, los tumores en ratones de control tratados con DMSO continuaron creciendo; únicamente CBDC402 (ambas concentraciones) proporcionó una ligera reducción del crecimiento tumoral, CPT-11 únicamente redujo el crecimiento tumoral, y las combinaciones de CBDC402 y CPT-11 redujeron o inhibieron significativamente el crecimiento tumoral.

Ejemplo 4: análisis de formación de colonias de la línea celular MK-45 derivada de cáncer gástrico humano

Se sembraron células MK-45 procedentes de una línea celular derivada de cáncer gástrico humano, en placas de 6 pocillos a razón de 1.000 células/pocillo. Tras el cultivo durante la noche, las células se trataron con 10 μM de diversos compuestos CBDC, 10 $\mu\text{g/ml}$ de CPT-11 o una combinación de compuestos CBDC y CPT-11 durante tres (3) horas. Los compuestos CBDC sometidos a ensayo fueron: CBDC402, CBDC412, CBDC413 y CBDC418. Se cambió el medio de cultivo y las células se cultivaron durante 14 días, fijando después las colonias con metanol y tiñendo con cristal violeta al 0,1%. Un tratamiento de 3 horas con 10 μM de CBDC402 únicamente provocó una supresión significativa de la formación de colonias por parte de las células MK-45, mientras que el tratamiento con 10 μM de CBDC412 provocó una ligera supresión de la formación de colonias, y 10 μM de CBDC413 ó de CBDC418 no presentó ningún efecto apreciable sobre la formación de colonias. El tratamiento con 10 $\mu\text{g/ml}$ de CPT-11 provocó una supresión significativa de la formación de colonias, mientras que la adición de 10 μM de CBDC402 aparentemente potenció el efecto de 10 $\mu\text{g/ml}$ de CPT-11, resultando en una supresión prácticamente completa de la formación de colonias. La combinación de 10 $\mu\text{g/ml}$ de CPT-11 y 10 μM de CBDC412 provocó una ligera supresión de la formación de colonias en un nivel superior al observado con CPT-11 solo, mientras que las combinaciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ de CPT-11 y 10 μM de CBDC413, CBDC418.

Ejemplo 5: el compuesto CBDC402 anula específicamente el punto de control G2 del ciclo celular

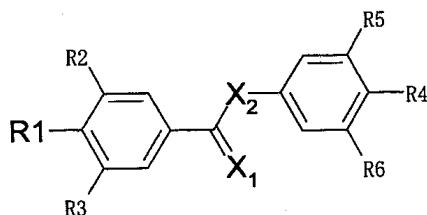
Se trataron células T normales activadas y células T leucémicas (células Jurkat) con agentes para inducir la acumulación de células en la etapa G2 o M, y se midió el efecto de CBDC402 sobre la progresión de las células por los puntos de control del ciclo celular. Tras los tratamientos, se recolectaron las células, se tiñó el ADN y se determinó el estadio del ciclo celular para cada célula mediante citometría de flujo tal como se ha mencionado anteriormente. En un experimento, las células T normales activadas no recibieron tratamiento (control) o se trataron con bleomicina, CBDC402 o una combinación de bleomicina y CBDC402. Tal como se muestra en la figura 10a, el tratamiento de bleomicina provocó la acumulación de una población menor de células en la etapa G2, y CBDC402 eliminó el incremento inducido por bleomicina de las células T normales activadas en la etapa G2. En otro experimento, las células T leucémicas (células Jurkat) no recibieron ningún tratamiento (control) o se trataron con bleomicina, CBDC402 o una combinación de bleomicina y CBDC402. Tal como se muestra en la figura 10b, la bleomicina provocó la acumulación de una población mayor de células en la etapa G2, y CBDC402 anuló el gran incremento inducido por bleomicina de células T leucémicas (células Jurkat) en la etapa G2. En otro experimento, las células T normales activadas no recibieron ningún tratamiento (control) o se trataron con colchicina o una combinación de CBDC420 y colchicina. Tal como se muestra en la figura 10c, la colchicina provocó una acumulación de células en la etapa M y CBDC402 no afectó al incremento inducido por colchicina de células T normales activadas en la etapa M. Estos resultados indican la especificidad de CBDC402 contra la acumulación en G2 (y no en el punto de control de la etapa M) e indican la especificidad de CBDC402 contra las células cancerosas.

Ejemplo 6: Síntesis de 4-fluoro-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico

Se añadieron diez ml de dioxano, 5 mmoles (1,1 g) de cloruro de ácido 4-bromo-benzoico y 5 mmoles (0,56 g) de 4-fluoro-fenol a un matraz de cuatro bocas de 50 ml de modo secuencial y se disolvieron a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota lentamente trietilamina disuelta en dioxano en dicha solución y la solución se agitó durante tres horas a temperatura ambiente. Los cristales precipitados se filtraron y se extrajeron con benceno. La solución extraída se lavó con hidrogenocarbonato sódico varias veces, se añadió anhídrido de magnesio y la solución resultante se secó y se filtró. La solución se destiló bajo presión reducida y se cristalizó. Los cristales crudos eran de color amarillento-blanco, y pesaban 1,37 g. Una parte de este cristal (0,5 g) se disolvió en benceno y se purificó con 100 g de gel de sílice (gel C-300 de Wako, Japón). El producto purificado era blanco y se confirmó que la pureza era de 99,93% mediante cromatografía líquida (LC). Se confirmó la estructura mediante RMN con los datos siguientes: RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,05 (2H, d, J=8,8 Hz), 7,83 (2H, d, J=8,8 Hz), 7,38-7,29 (4H, m) RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 159,72 (C-F, d, J=240 Hz) 163,95 (C=O).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que presenta la estructura siguiente:



5

en la que:

R₁ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F) o yodo (I);

10

R₂ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F), yodo (I), metilo (CH₃), O-metilo (OCH₃), hidroxilo (OH), CH(CH₃)₂, CHO, CHOCH₃, O(CH₂)_nCH₃, OCO(C₆H₁₂)Cl, COOCH₃ o hidrógeno;

15

R₃ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F), yodo (I), metilo (CH₃), O-metilo (OCH₃), hidroxilo (OH), CH(CH₃)₂, CHO, CHOCH₃, O(CH₂)_nCH₃, OCO(C₆H₁₂)Cl, COOCH₃ o hidrógeno;

R₄ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F), yodo (I), metilo (CH₃), O-metilo (OCH₃), hidroxilo (OH), CH(CH₃)₂, CHO, CHOCH₃, O(CH₂)_nCH₃, OCO(C₆H₁₂)Cl, COOCH₃ o hidrógeno;

20

R₅ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F), yodo (I), metilo (CH₃), O-metilo (OCH₃), hidroxilo (OH), CH(CH₃)₂, CHO, CHOCH₃, O(CH₂)_nCH₃, OCO(C₆H₁₂)Cl, COOCH₃ o hidrógeno;

R₆ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F), yodo (I), metilo (CH₃), O-metilo (OCH₃), hidroxilo (OH), CH(CH₃)₂, CHO, CHOCH₃, O(CH₂)_nCH₃, OCO(C₆H₁₂)Cl, COOCH₃ o hidrógeno;

25

X₁ es nitrógeno (NH), oxígeno (O) o azufre (S); y

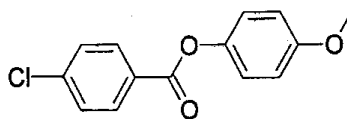
X₂ es oxígeno (O) o azufre (S)

30

para la utilización en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular.

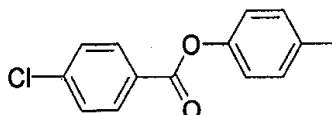
2. Compuesto para la utilización en el tratamiento de un trastorno de la proliferación celular según la reivindicación 1, en el que el compuesto es el 4-metoxi-fenil-éster del ácido 4-cloro-benzoico (CBDC004) que presenta la estructura:

35



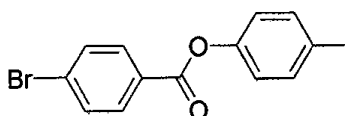
o en el que el compuesto es el p-tolil-éster del ácido 4-cloro-benzoico (CBDC401) que presenta la estructura:

40

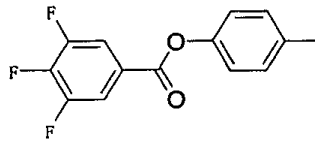


o en el que el compuesto es el p-tolil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC402) que presenta la estructura:

45

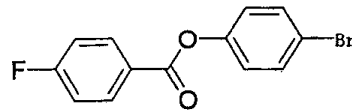


o en el que el compuesto es el p-tolil-éster del ácido 3,4,5-trifluoro-benzoico (CBDC403) que presenta la estructura:



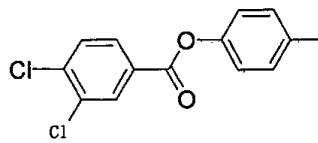
o en el que el compuesto es el 4-bromo-fenil-éster del ácido 4-fluoro-benzoico (CBDC404) que presenta la estructura:

5



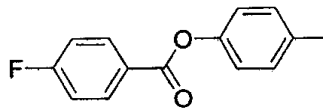
o en el que el compuesto es el p-tolil-éster del ácido 3,4-dicloro-benzoico (CBDC405) que presenta la estructura:

10



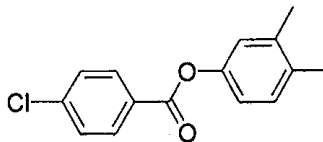
o en el que el compuesto es el p-tolil-éster del ácido 4-fluoro-benzoico (CBDC407) que presenta la estructura:

15



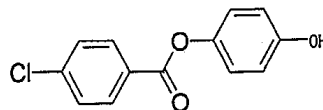
o en el que el compuesto es el 3,4-dimetil-fenil-éster del ácido 4-cloro-benzoico (CBDC409) que presenta la estructura:

20



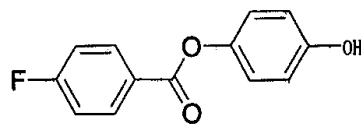
o en el que el compuesto es el 4-hidroxi-fenil-éster del ácido 4-cloro-benzoico (CBDC410) que presenta la estructura:

25

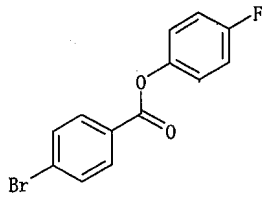


o en el que el compuesto es el 4-hidroxi-fenil-éster del ácido 4-fluoro-benzoico (CBDC411) que presenta la estructura:

30

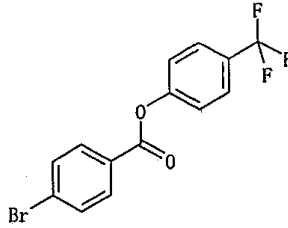


o en el que el compuesto es el 4-fluoro-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC412) que presenta la estructura:



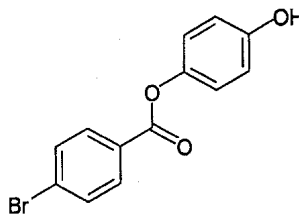
o en el que el compuesto es el 4-trifluorometil-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC413) que presenta la estructura:

5



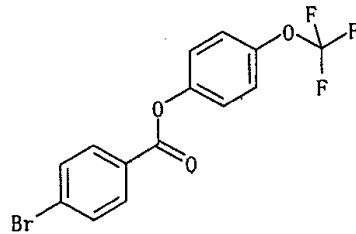
o en el que el compuesto es el 4-hidroxi-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC414) que presenta la estructura:

10



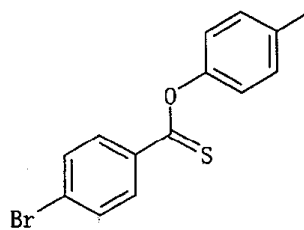
o en el que el compuesto es el 4-trifluorometoxi-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC415) que presenta la estructura:

15

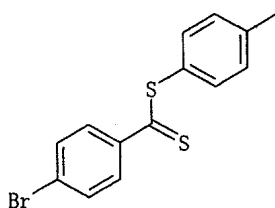


o en el que el compuesto es el O-p-tolil-éster del ácido 4-bromo-tiobenzoico (CBDC440) que presenta la estructura:

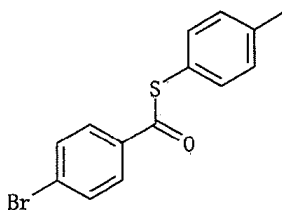
20



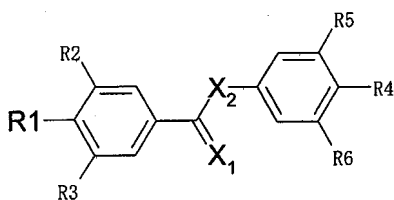
o en el que el compuesto es el p-tolil-éster del ácido 4-bromo-ditiobenzoico (CBDC441) que presenta la estructura:



o en el que el compuesto es el S-p-tolil-éster del ácido 4-bromo-tiobenzoico (CBDC442) que presenta la estructura:



5 3. Método *in vitro* de anulación del punto de control G2 del ciclo celular en una célula, o para destruir o suprimir una célula que presenta un trastorno de la proliferación, que comprende la administración a la célula en una cantidad efectiva para inhibir el punto de control G2 de un compuesto que presenta la estructura siguiente:



10 en la que:

15 R₁ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F) o yodo (I)

R₂ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F), yodo (I), metilo (CH₃), O-metilo (OCH₃), hidroxilo (OH), CH(CH₃)₂, CHO, CHOCH₃, O(CH₂)_nCH₃, OCO(C₆H₁₂)Cl, COOCH₃ o hidrógeno;

20 R₃ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F), yodo (I), metilo (CH₃), O-metilo (OCH₃), hidroxilo (OH), CH(CH₃)₂, CHO, CHOCH₃, O(CH₂)_nCH₃, OCO(C₆H₁₂)Cl, COOCH₃ o hidrógeno;

R₄ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F), yodo (I), metilo (CH₃), O-metilo (OCH₃), hidroxilo (OH), CH(CH₃)₂, CHO, CHOCH₃, O(CH₂)_nCH₃, OCO(C₆H₁₂)Cl o COOCH₃;

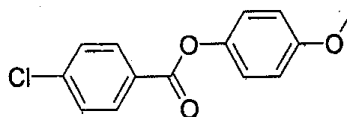
25 R₅ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F), yodo (I), metilo (CH₃), O-metilo (OCH₃), hidroxilo (OH), CH(CH₃)₂, CHO, CHOCH₃, O(CH₂)_nCH₃, OCO(C₆H₁₂)Cl, COOCH₃ o hidrógeno;

30 R₆ es bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F), yodo (I), metilo (CH₃), O-metilo (OCH₃), hidroxilo (OH), CH(CH₃)₂, CHO, CHOCH₃, O(CH₂)_nCH₃, OCO(C₆H₁₂)Cl, COOCH₃ o hidrógeno;

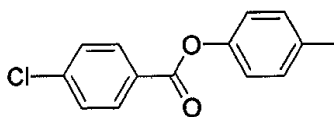
X₁ es nitrógeno (NH), oxígeno (O) o azufre (S); y

X₂ es oxígeno (O) o azufre (S),

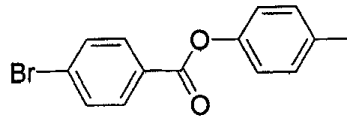
35 4. Método según la reivindicación 3, en el que el compuesto es el 4-metoxi-fenil-éster del ácido 4-cloro-benzoico (CBDC004) que presenta la estructura:



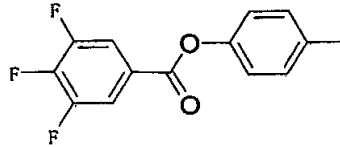
40 o en el que el compuesto es el p-tolil-éster del ácido 4-cloro-benzoico (CBDC401) que presenta la estructura:



45 o en el que el compuesto es el p-tolil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC402) que presenta la estructura:

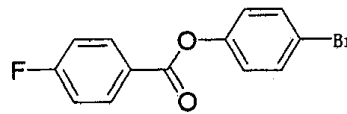


o en el que el compuesto es el p-tolil-éster del ácido 3,4,5-trifluoro-benzoico (CBDC403) que presenta la estructura:



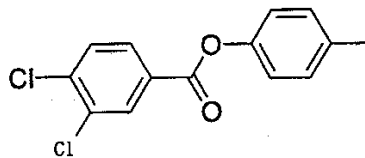
5

o en el que el compuesto es el 4-bromo-fenil-éster del ácido 4-fluoro-benzoico (CBDC404) que presenta la estructura:



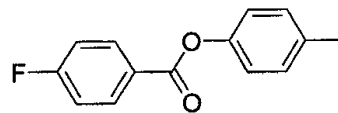
10

o en el que el compuesto es el p-tolil-éster del ácido 3,4-dicloro-benzoico (CBDC405) que presenta la estructura:



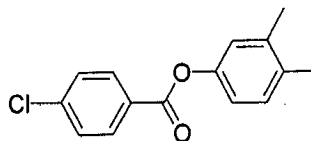
15

o en el que el compuesto es el p-tolil-éster del ácido 4-fluoro-benzoico (CBDC407) que presenta la estructura:



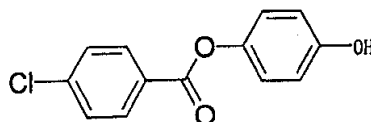
20

o en el que el compuesto es el 3,4-dimetil-fenil-éster del ácido 4-cloro-benzoico (CBDC409) que presenta la estructura:



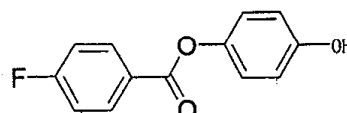
25

o en el que el compuesto es el 4-hidroxi-fenil-éster del ácido 4-cloro-benzoico (CBDC410) que presenta la estructura:

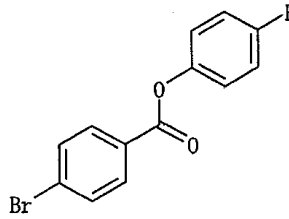


30

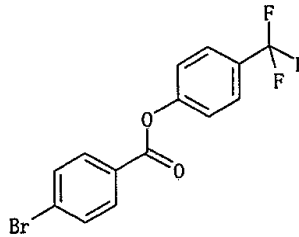
o en el que el compuesto es el 4-hidroxi-fenil-éster del ácido 4-fluoro-benzoico (CBDC411) que presenta la estructura:



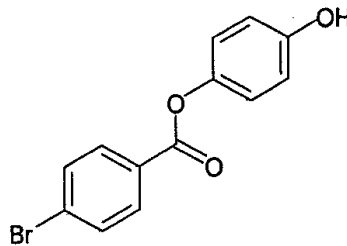
o en el que el compuesto es el 4-fluoro-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC412) que presenta la estructura:



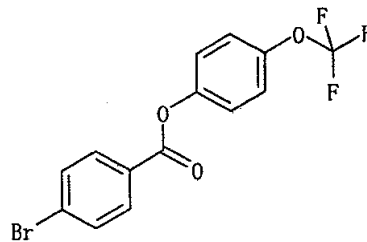
5 o en el que el compuesto es el 4-trifluorometil-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC413) que presenta la estructura:



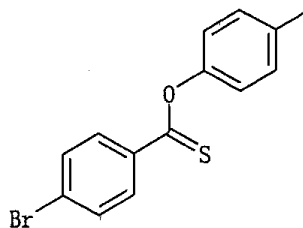
10 o en el que el compuesto es el 4-hidroxi-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC414) que presenta la estructura:



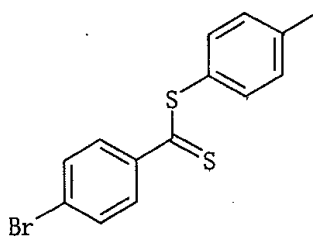
15 o en el que el compuesto es el 4-trifluorometoxi-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC415) que presenta la estructura:



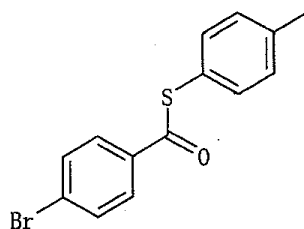
20 o en el que el compuesto es el O-p-tolil-éster del ácido 4-bromo-tiobenzoico (CBDC440) que presenta la estructura:



25 o en el que el compuesto es el p-tolil-éster del ácido 4-bromo-ditiobenzoico (CBDC441) que presenta la estructura:

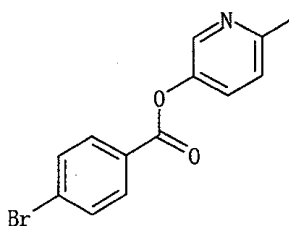


o en el que el compuesto es el S-p-tolil-éster del ácido 4-bromo-tiobenzoico (CBDC442) que presenta la estructura:



5

5. Compuesto 6-metil-piridín-3-il-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC418) que presenta la estructura:



10

para la utilización en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular.

6. Compuesto para la utilización en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular según la reivindicación 1, 2 ó 5, en el que la anulación del punto de control G2 del ciclo celular anula el punto de control G2 inducido por daños en el ADN en una célula.

15

7. Compuesto para la utilización en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular según la reivindicación 6, en el que la anulación del punto de control G2 del ciclo celular está destinada a suprimir o destruir selectivamente las células con el ADN dañado en una población de células que comprende células normales y células con el ADN dañado.

20

8. Compuesto para la utilización en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular según la reivindicación 6 ó 7, en el que la anulación del punto de control G2 del ciclo celular está destinada a la sensibilización de las células con el ADN dañado a un agente o tratamiento que daña el ADN.

25

9. Compuesto para la utilización en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que las células con el ADN dañado son células cancerosas.

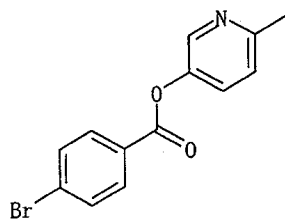
10. Compuesto para la utilización en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que las células con el ADN dañado son células tumorales de xenoinjerto.

30

11. Compuesto para la utilización en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular según la reivindicación 7 u 8, en el que el compuesto se utiliza en combinación con por lo menos un agente que daña el ADN.

12. Método *in vitro* de anulación del punto de control G2 del ciclo celular en una célula, o para la destrucción o supresión de una célula que presenta un trastorno de la proliferación, que comprende administrar a la célula en una cantidad efectiva para inhibir el punto de control G2 el compuesto 6-metil-piridín-3-il-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC418) que presenta la estructura:

35



13. Método según la reivindicación 3, 4 ó 12, en el que la anulación del punto de control G2 del ciclo celular anula el punto de control G2 inducido por daños en el ADN en una célula.
- 5
14. Método según la reivindicación 13, en el que la anulación del punto de control G2 del ciclo celular está destinada a suprimir o destruir selectivamente las células con el ADN dañado en una población de células que comprende células normales y células con el ADN dañado.
- 10
15. Método según la reivindicación 13 ó 14, en el que la anulación del punto de control G2 del ciclo celular está destinada a sensibilizar las células con el ADN dañado frente a un agente o tratamiento que daña el ADN.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que las células con el ADN dañado son células cancerosas.
- 15
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que las células con el ADN dañado son células tumorales de xenoinjerto.
18. Método según la reivindicación 14 ó 15, en el que el compuesto se utiliza en combinación con por lo menos un agente que daña el ADN.
- 20
19. Composición que comprende un compuesto seleccionado de entre: p-tolil-éster del ácido 3,4,5-trifluoro-benzoico (CBDC403); 4-trifluorometil-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC413); 4-hidroxi-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC414); 4-trifluorometoxi-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC415); 6-metil-piridín-3-il-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC418); O-p-tolil-éster del ácido 4-bromo-tiobenzoico (CBDC440); y p-tolil-éster del ácido 4-bromo-ditiobenzoico (CBDC441).
- 25
20. Composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una composición según la reivindicación 19.
- 30
21. Composición farmacéutica según la reivindicación 20, que comprende además un agente que daña el ADN.
22. Composición que comprende un compuesto para la utilización en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular, en la que el compuesto se selecciona de entre: p-tolil-éster del ácido 3,4,5-trifluorobenzoico (CBDC403); p-tolil-éster del ácido 3,4-dicloro-benzoico (CBDC405); p-tolil-éster del ácido 2,4-dicloro-benzoico (CBDC406); p-tolil-éster del ácido 4-fluorobenzoico (CBDC407); p-tolil-éster del ácido 2,3,4,5,6-pentafluoro-benzoico (CBDC408); 4-hidroxi-fenil-éster del ácido 4-fluoro-benzoico (CBDC411); 4-trifluorometil-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC413); 4-hidroxi-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC414); 4-trifluorometoxi-fenil-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC415); 6-metil-piridín-3-il-éster del ácido 4-bromo-benzoico (CBDC418); O-p-tolil-éster del ácido 4-bromo-tiobenzoico (CBDC440); p-tolil-éster del ácido 4-bromo-ditiobenzoico (CBDC441); y S-p-tolil-éster del ácido 4-bromo-tiobenzoico (CBDC442).
- 35
- 40

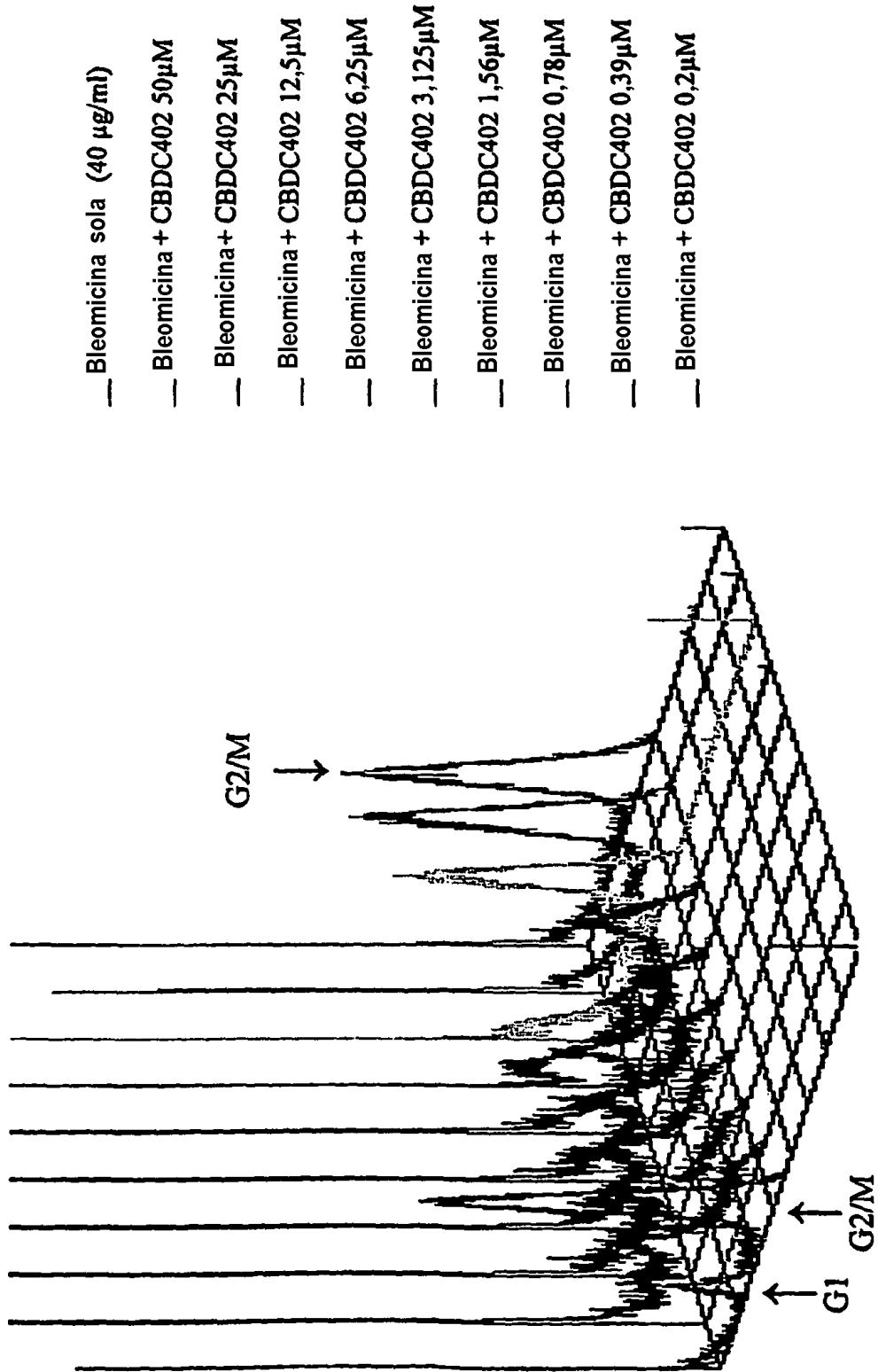


FIGURA 1

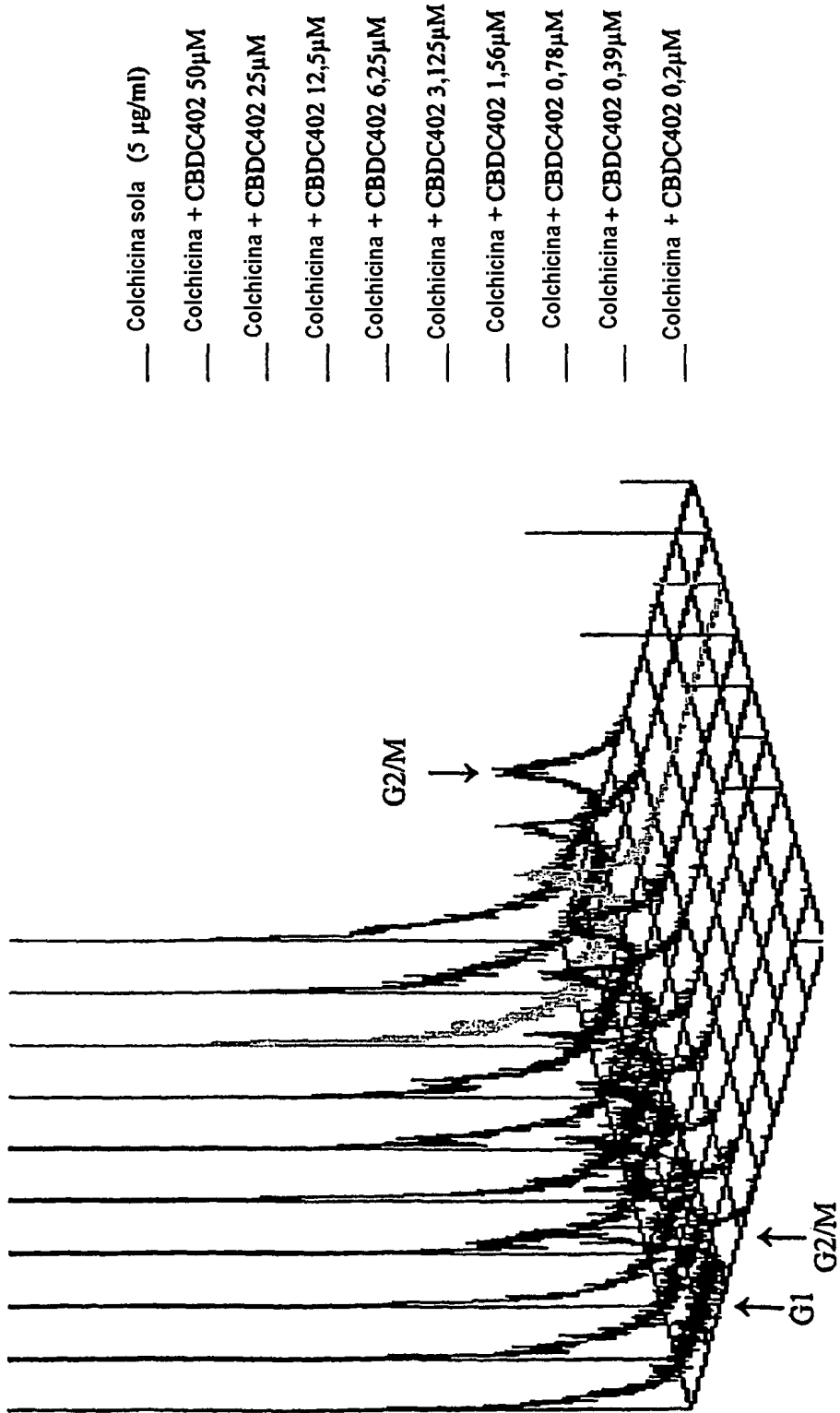
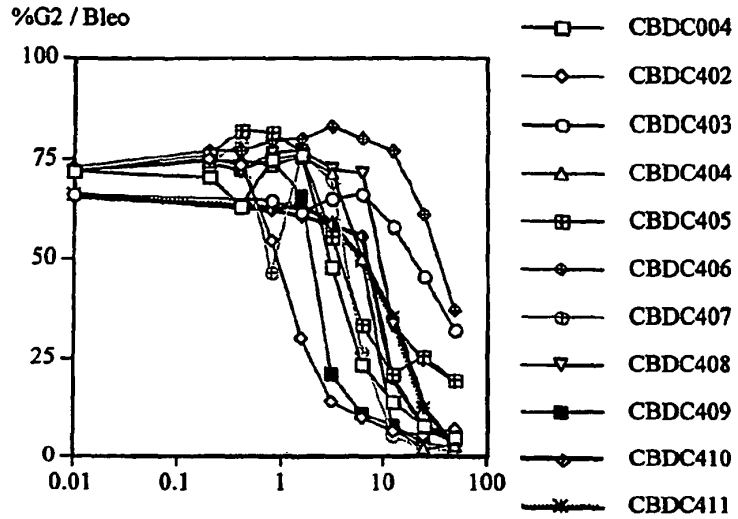


FIGURA 2

A. Anulación del punto de control G2 por parte de diversos compuestos CBDC



B. Relación entre estructura y actividad de anulación del punto de control G2

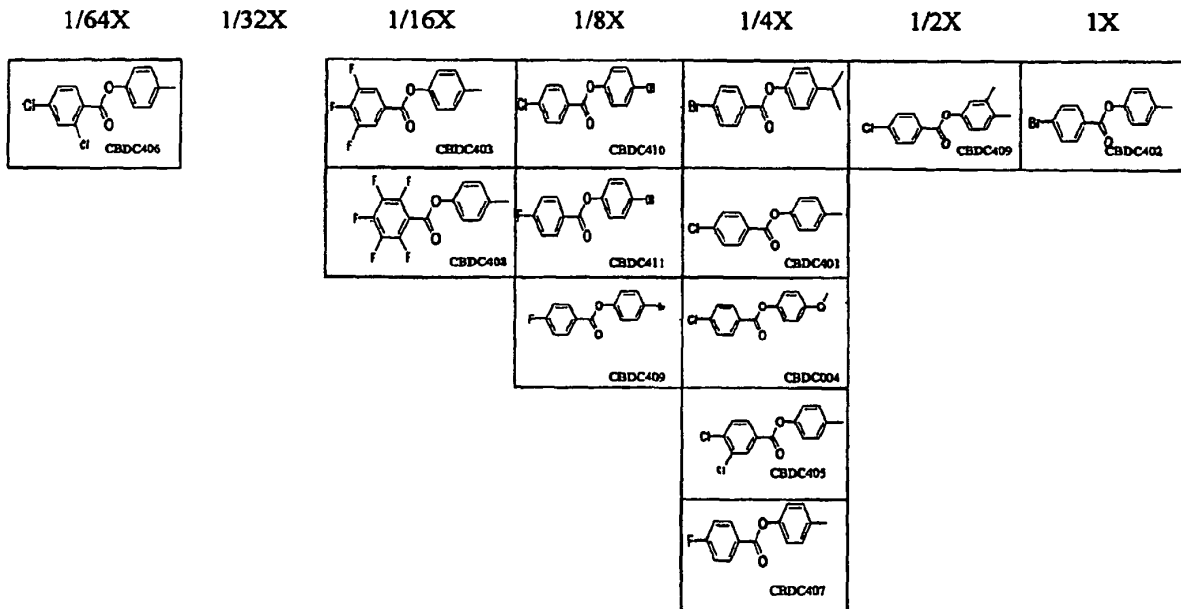
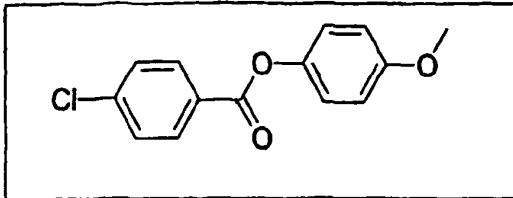


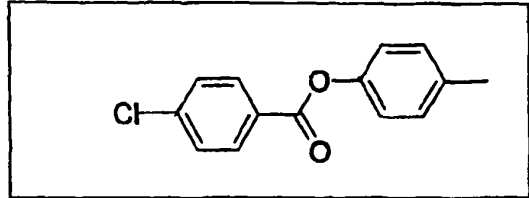
FIGURA 3

CBDC004



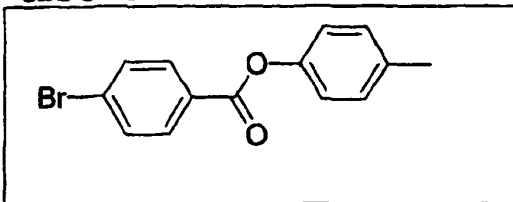
4-metoxi-fenil-éster de ácido 4-cloro-benzoico

CBDC401



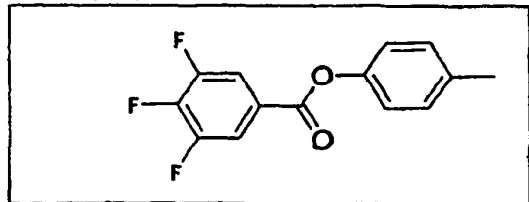
p-tolil-éster de ácido 4-cloro-benzoico

CBDC402



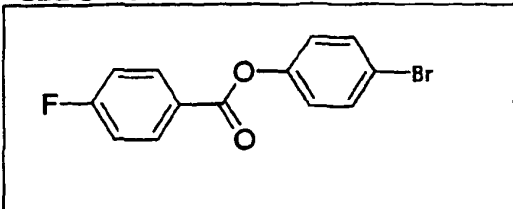
p-tolil-éster de ácido 4-bromo-benzoico

CBDC403



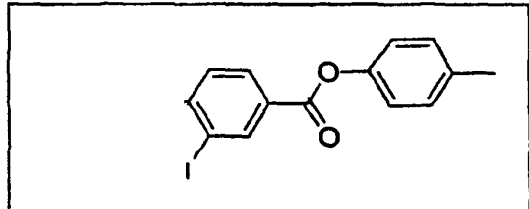
p-tolil-éster de ácido 3,4,5-trifluoro-benzoico

CBDC404



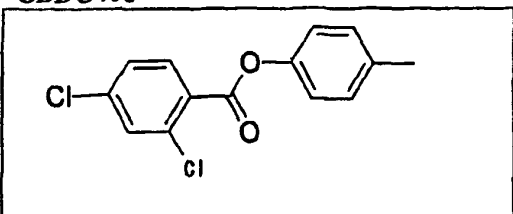
4-bromo-fenil-éster de ácido 4-fluoro-benzoico

CBDC405



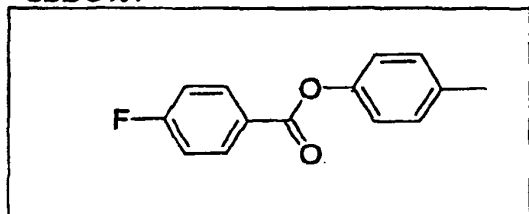
p-tolil-éster de ácido 3,4-dicloro-benzoico

CBDC406



p-tolil-éster de ácido 2,4-dicloro-benzoico

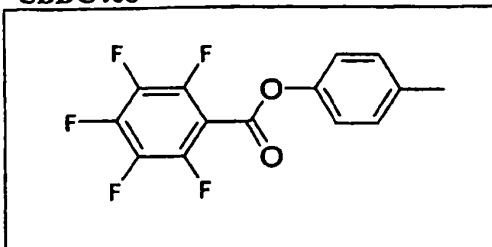
CBDC407



p-tolil-éster de ácido 4-fluoro-benzoico

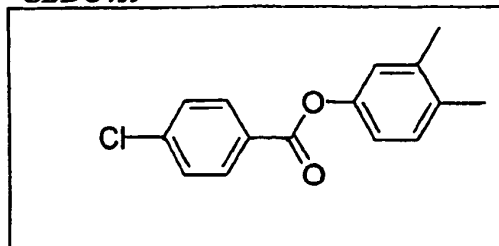
FIGURA 4 (página 1 de 3)

CBDC408



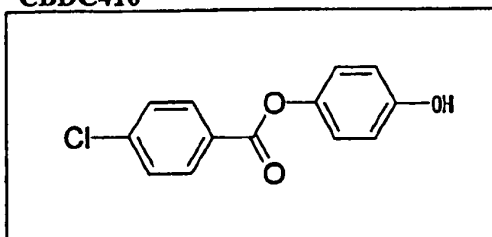
p-tolil-éster de ácido 2,3,4,5,6-pentafluoro-benzoico

CBDC409



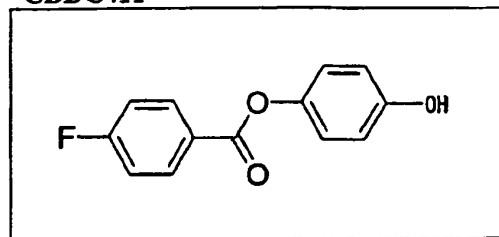
3,4-dimetil-fenil-éster de ácido 4-cloro-benzoico

CBDC410



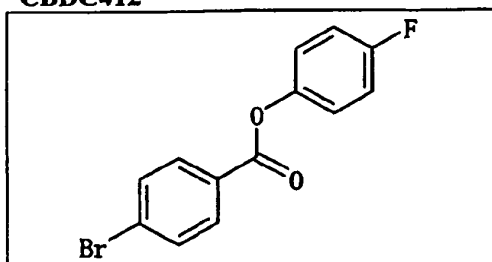
4-hidroxi-fenil-éster de ácido 4-cloro-benzoico

CBDC411



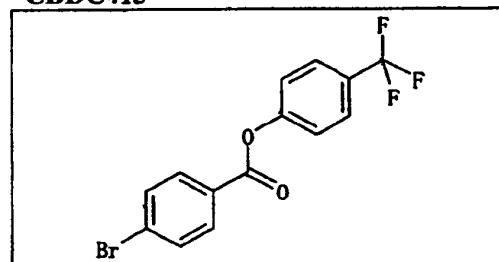
4-hidroxi-fenil-éster de ácido 4-fluoro-benzoico

CBDC412



4-fluoro-fenil-éster de ácido 4-bromo-benzoico

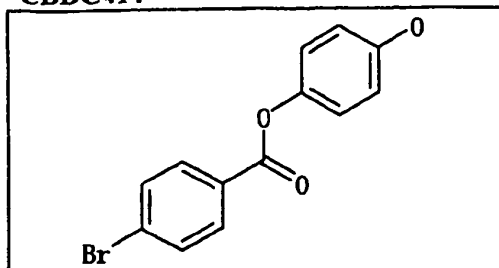
CBDC413



4-trifluorometil-fenil-éster de ácido 4-bromo-benzoico

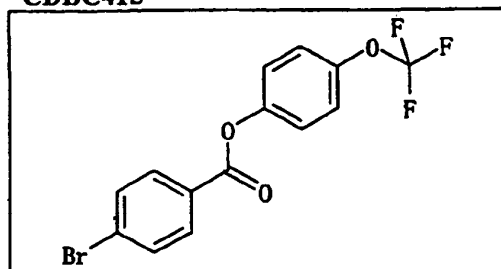
FIGURA 4, Continuación (página 2 de 3)

CBDC414



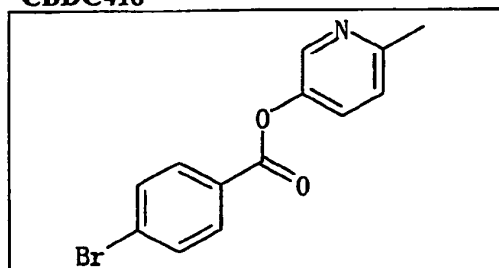
4-hidroxi-fenil-éster de ácido 4-bromo-benzoico

CDBC415



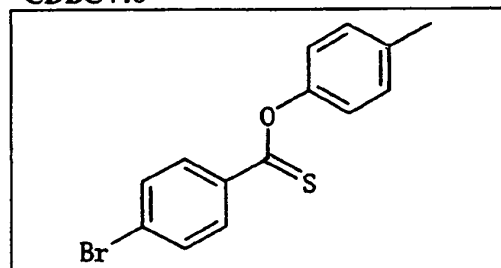
4-trifluorometoxi-fenil-éster de ácido 4-bromo-benzoico

CBDC418



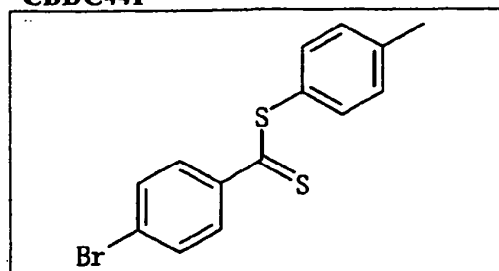
6-metil-piridín-3-il-éster de ácido 4-bromo-benzoico

CDBC440



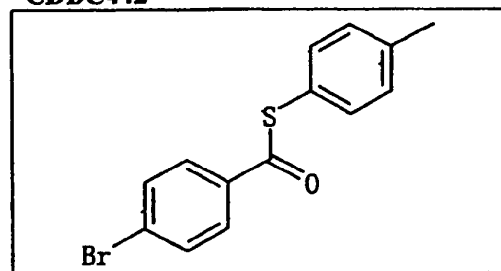
O-p-tolil-éster de ácido 4-bromo-tiobenzoico

CBDC441



p-tolil-éster de ácido 4-bromo-ditiobenzoico

CDBC442



S-p-tolil-éster de ácido 4-bromo-tiobenzoico

FIGURA 4, Continuación (página 3 de 3)

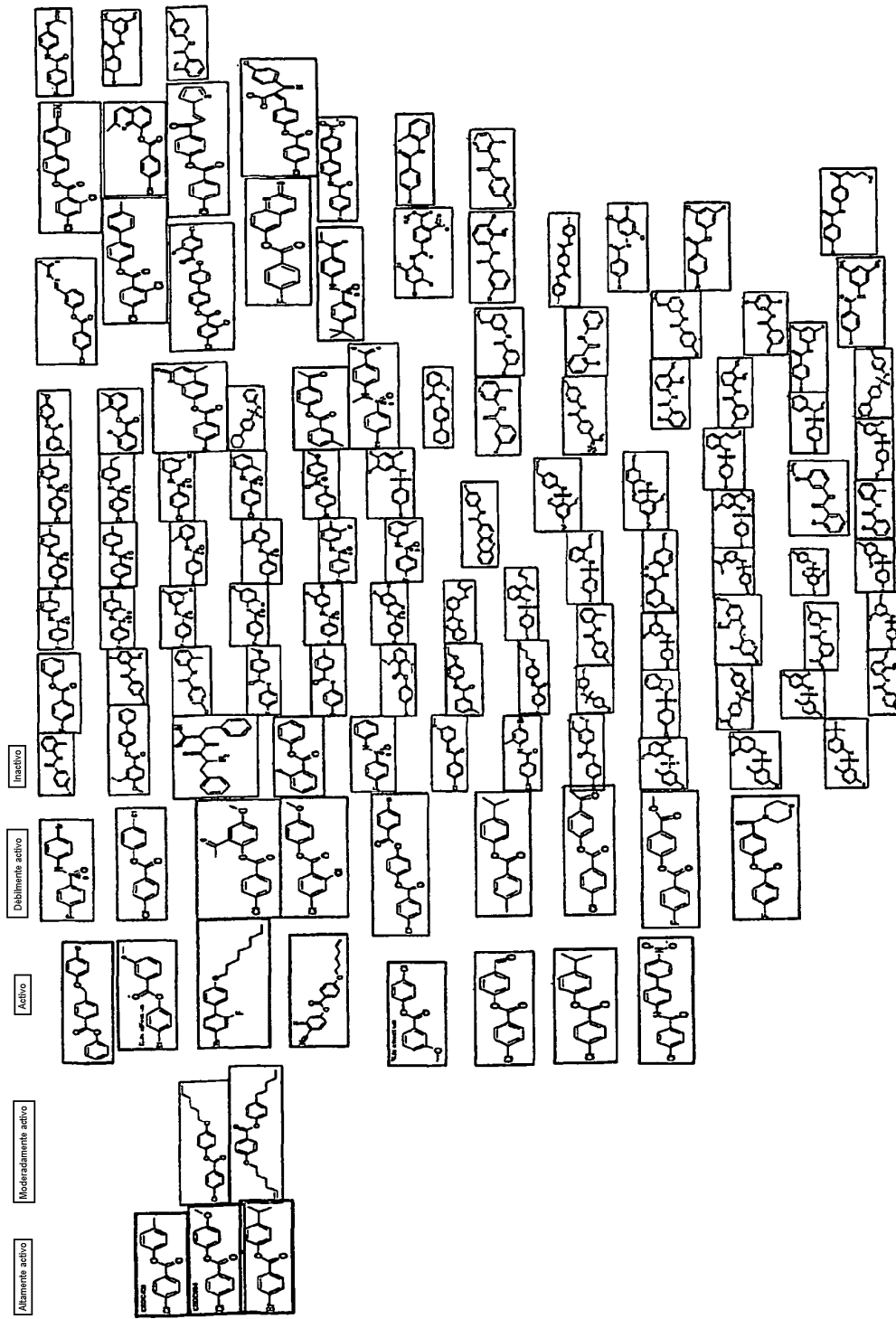


FIGURA 5

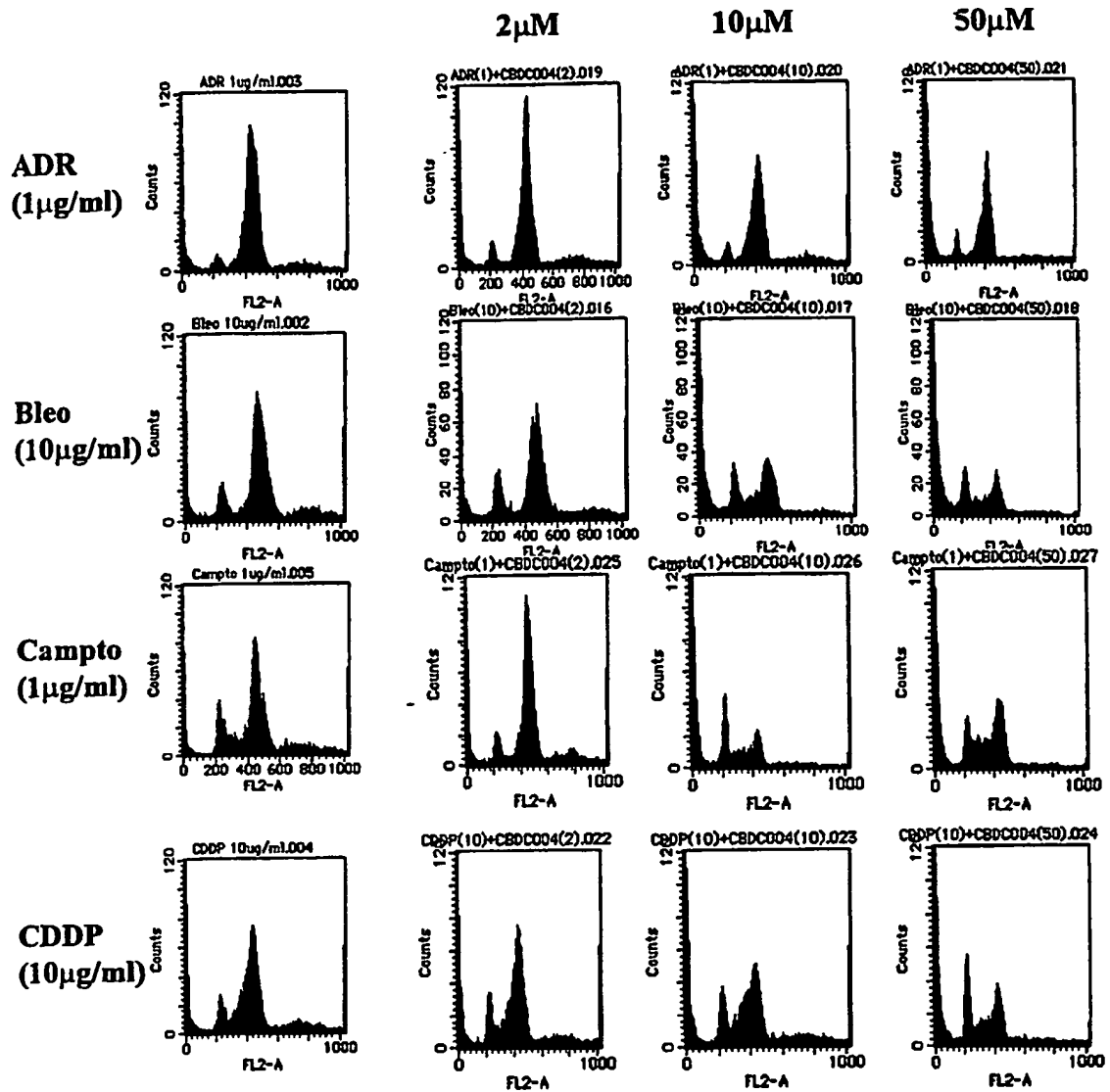


FIGURA 7

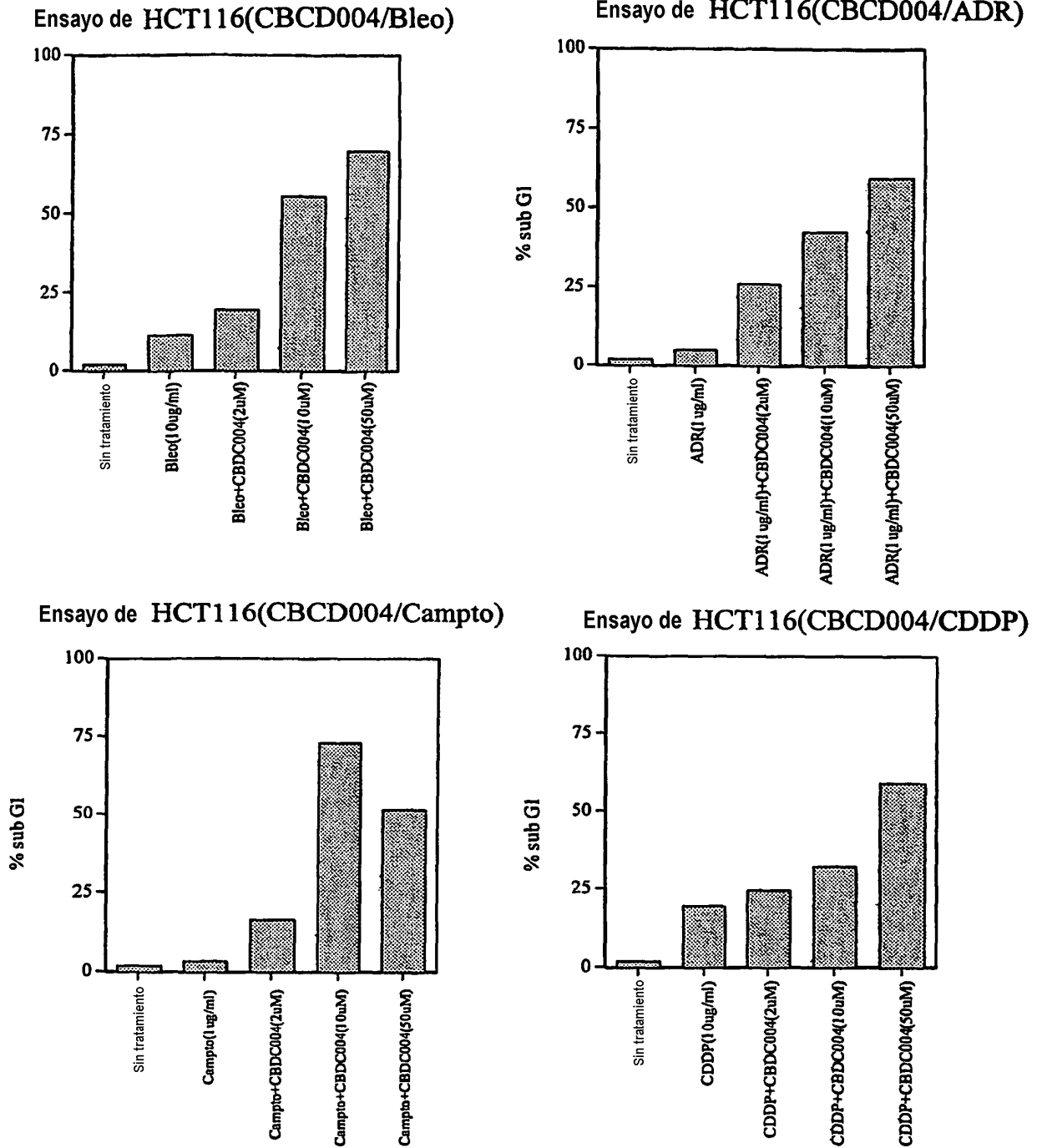


FIGURA 8

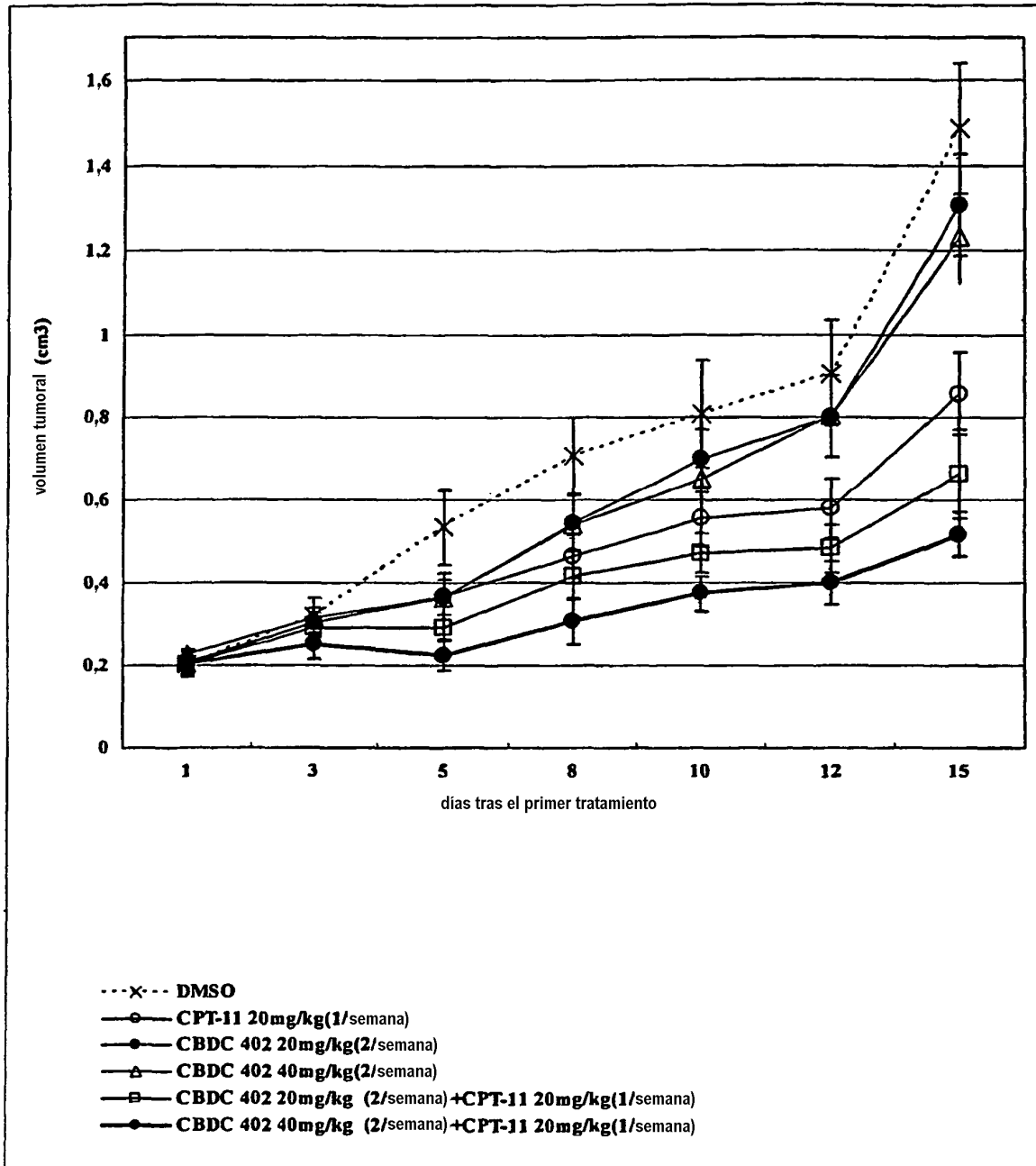


FIGURA 9

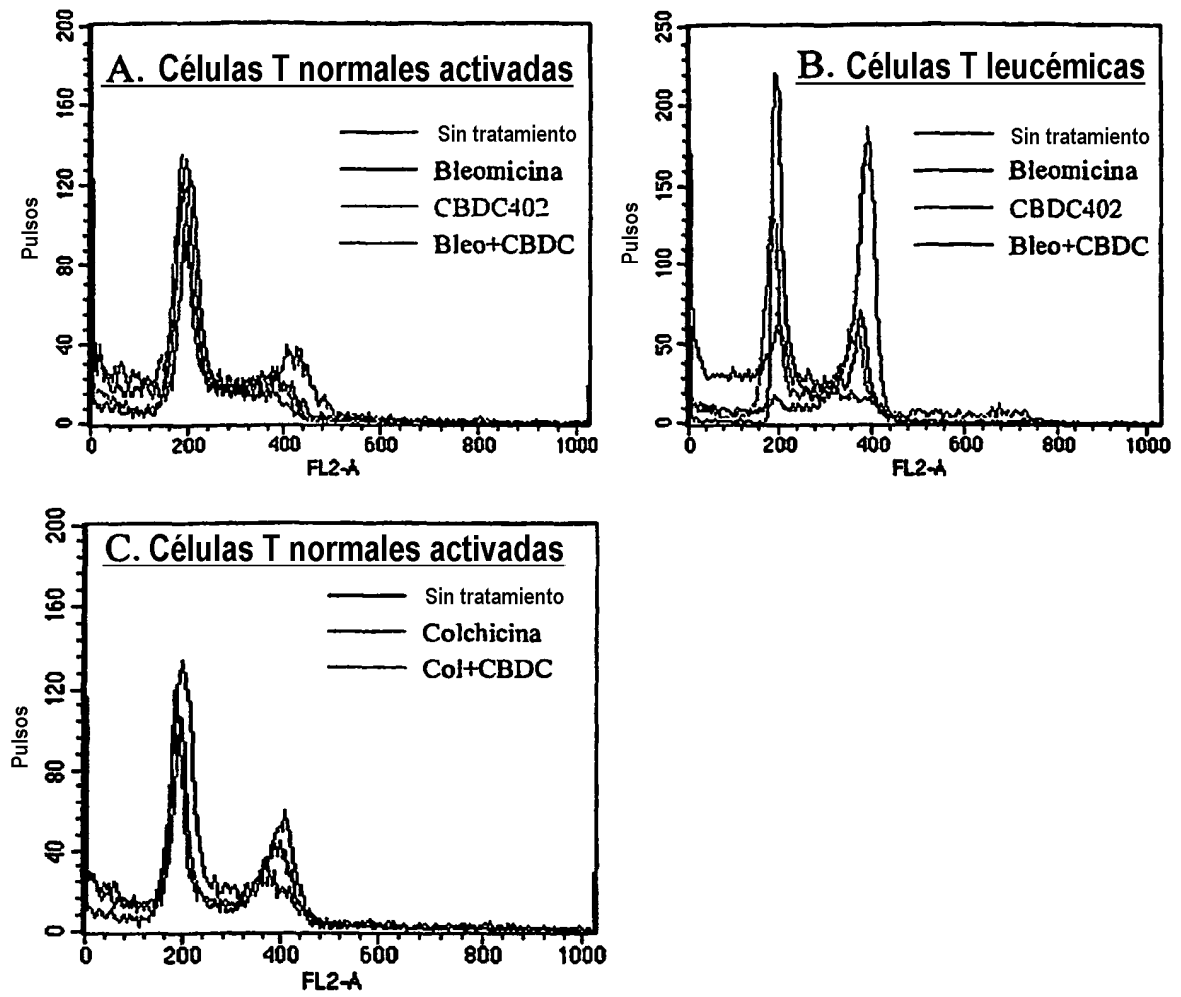


FIGURA 10