

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 959**

51 Int. Cl.:

C07F 9/22	(2006.01) C07C 327/44	(2006.01)
C07D 487/04	(2006.01) C07C 313/06	(2006.01)
C07D 239/42	(2006.01) C07C 275/36	(2006.01)
C07D 239/36	(2006.01) C07C 275/22	(2006.01)
C07D 233/54	(2006.01) C07C 275/18	(2006.01)
C07D 235/14	(2006.01)	
C07D 215/18	(2006.01)	
C07D 213/82	(2006.01)	
C07D 207/36	(2006.01)	
C07C 237/30	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2006 E 06753157 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 1892245**

54 Título: **Compuestos antineoplásicos y composiciones farmacéuticas de los mismos**

30 Prioridad:

12.05.2005 CU 912005

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

13.11.2015

73 Titular/es:

**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y
BIOTECNOLOGÍA (100.0%)
Ave. 31 entre 158 y 190 Cubanacan, Playa
Ciudad de La Habana 10600, CU**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, ROLANDO
EDUARDO;
VERA ÁLVAREZ, ROBERTO;
DE LA NUEZ VEULENS, ANIA;
MAZOLA REYES, YULIET;
PEREA RODRÍGUEZ, SILVIO ERNESTO;
ACEVEDO CASTRO, BORIS ERNESTO;
MUSACCHIO LASA, ALEXIS y
UBIETA GÓMEZ, RAIMUNDO**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 550 959 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 antineoplásicos y composiciones farmacéuticas de los mismos

Campo de la invención

- 5 La presente invención se puede describir en el campo de la farmacología molecular, particularmente en relación con oncología, y más específicamente con compuestos químicos obtenidos por modelado molecular *in silico*, que tiene una acción citotóxica clara y efecto antitumoral con base en su capacidad para bloquear el sitio aceptador de fosfato en sustratos de quinasa caseína 2, ya sea por interacción directa o indirecta.

Antecedentes

- 10 La quinasa caseína 2 (CK2) es una enzima de serina/treonina implicada en el aumento de la proliferación celular, siendo el núcleo su ubicación intracelular principal durante el proceso de transformación maligna (Tawfic S., Yu S., Wang H., et al. (2001) Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol. Histopathol.* 16:573-582). Más aún, algunas proteínas virales clave para el Virus de Inmunodeficiencia Humana patógeno (VIH) y Virus de Hepatitis C (HCV) se han reportado como sustratos CK2 (Meggio F., Marin O., et al. (2001) *Mol Cell Biochem* 227:145-151; Franck N., Le Seyec J., et al. (2005) Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome. *J Virol.* 79:2700-2008).

- 15 Los hallazgos de otros grupos en todo el mundo, también han confirmado la existencia de niveles elevados de CK2 en diferentes tumores sólidos de origen epitelial, en órdenes que varían de 3 a 7 veces más, respecto al tejido normal (Tawfic S., Yu S., et al. (2001) Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol Histopathol.* 16:573-582; Faust R.A., Gapany M., et al (1996) Elevated protein kinase CK2 activity in chromatin of head and neck tumors: association with malignant transformation. *Cancer Letters* 101:31-35), además de la actividad de fosforilación de la enzima CK2 es un evento muy importante en la transformación maligna de las células, constituye un fuerte marcador en la progresión del tumor (Seldin D.C., Leder P. (1995) Casein Kinase IIa transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science* 267:894-897), la sobreexpresión de CK2 por otra parte conduce a la tumorigénesis de células mamarias por el aumento de la cascada de señalización Wnt/beta-catenina (Landesman-Bollag E., Romien-Mourez R., et al (2001) Protein Kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis. *Oncogene* 20:3247-3257). Los recientes hallazgos también sugieren que el CK2 cumple una función esencial en algunos otros procesos como la remodelación de cromatina (Barz T., Ackenmann K., et al. (2003) Genome-wide expression screens indicate a global role for protein kinase CK2 in chromatin remodelling. *J Cell Sci.* 116:1563-1577) y la regulación de la supervivencia celular (Unger G.M., Davis A.T., Slaton J.W., Ahmed K. (2004) Protein kinase CK2 as regulator of cell survival: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 4:77-84). De suma importancia, para comprender el proceso de desarrollo del cáncer, han sido los hallazgos que demuestran que la fosforilación mediada por CK2 es una señal muy fuerte para la supervivencia celular, por lo tanto, se considera esta enzima como un mediador antiapoptótico de la fisiología celular (Ahmed K., Gerber D.A., Cochet C. (2002) Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol.* 12:226-229; Torres J., Rodriguez J., et al (2003) Phosphorylation-regulated cleavage of the tumour suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. *J Biol Chem*, 278:30652-60).

- 20 Sobre la base de los hallazgos anteriores, se ha confirmado la fosforilación mediada por CK2 como un evento bioquímico, adecuado para ser utilizado como un objetivo potencial para la intervención terapéutica en cáncer, haciendo a todos los inhibidores potenciales de dicho evento candidatos potenciales para el tratamiento de dicha afección. Hasta la fecha, diversos grupos de investigación en todo el mundo han estado desarrollando diferentes estrategias para inhibir la fosforilación mediada por CK2 con dos enfoques experimentales: a) La inhibición directa de la enzima CK2, o b) el bloqueo del sitio de fosforilación cerca del dominio ácido descrito como común a todos los sustratos de CK2. Para ambos métodos, los autores han sido capaces de demostrar el concepto de que el evento inhibición de fosforilación mediada por CK2 conduce a la inducción de apoptosis en las células tumorales, lo que implica una validación experimental de CK2 como un objetivo muy promisorio en el hallazgo de fármacos para tratamiento del cáncer.

- 25 Por ejemplo, se ha probado un inhibidor directo de la enzima como el 4,5,6,7-tetrabromotriazol (TBB) como un potente inductor de degradación dependiente de caspasa y apoptosis en las células Jurkat, en el rango de concentración micromolar (Ruzzene M., Penzo D., Pinna L. (2002) Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells. *Biochem J.* 364:41-47). También, al inhibir la expresión de la enzima CK2 al utilizar oligonucleótidos anticodificantes, un efecto apoptótico *in vitro* y se ha demostrado la acción antitumoral en un modelo de cáncer experimental en ratones (Guo C., Yu S., et al. (2001) A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells. *J Biol Chem*, 276:5992-5999; Slaton J.W., et al. (2004) Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model. *Mol Cancer Res.* 2:712-721).

Otros compuestos, como los derivados de antraquinona, flavonoides y azobencilimidazoles halogenados, se han descrito como inhibidores de sitio de unión a ATP (Sarno S., et al. (2002) Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors. *Pharmacol Therapeutics* 93:159-168), y se ha reportado el ácido 5-oxo-5,6-dihidroindolo (1,2-a) quinazolin-7-ilo acético (IQA) como un inhibidor de CK2 selectivo utilizando detección de alto rendimiento (Vangrevelinghe E., et al. (2003) Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA). *J. Med. Chem.* 46:2556-2662).

Martinez. A. P., et al., (1967) describen un número de compuestos para actividades antivirales y antitumorales (Martinez. A., et al., *J. MED. CHEM.*, vol. 10, 1967, page 1192). Sah. P. P. T., et al. (1950) describen la tiosemicarbazida como un reactivo para la identificación de aldehídos, cetonas, y quinonas (Sah. P. P. T., et al., *Reel. Trav. Chim.*, vol. 69, 1950, pages 1545-1553).

Los compuestos mencionados anteriormente han mostrado su efecto inhibidor de actividad CK2 en el rango micromolar para la Concentración Inhibidora 50 (IC50), pero no se han reportado evidencias de ninguna acción antitumoral en modelos experimentales de cáncer.

El otro método descrito para inhibir el proceso de fosforilación mediada por CK2 ha sido el bloqueo del sitio de fosforilación dentro del dominio ácido encontrado en los sustratos de esta enzima. En la solicitud de patente WO 03/054002 y en el trabajo de Perea S.E et al. (2004) Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide impairing the phosphorylation by the protein kinase CK2. *Cancer Res.* 64:7127-7129, los autores proponen el uso de una familia de péptidos cíclicos que bloquean la fosforilación del sustrato CK2 in vitro, y muestran la citotoxicidad de células tumorales y el efecto antitumoral en modelos de cáncer de pre-clínicos. Sin embargo, los péptidos descritos en dichos informes tienen la limitación de no ser capaces per se de penetrar en las células, por lo que requieren un péptido de permeación de membrana que se fusiona a estas. En términos generales, cuando se compara con moléculas pequeñas, el uso de péptidos tiene los inconvenientes de una estabilidad in vivo reducida en la circulación, degradación, es muy difícil formular en administración oral y no se transportan fácilmente dentro de las células ((Ludger Wess, *Isogenica: Improving peptides*, Biocentury October 25, 2004). Otros problemas de péptidos ampliamente descritos en la literatura son el de la depuración más rápida, su potencial inmunogénico, y se sabe que su coste por dosis terapéutica es generalmente superior a los fármacos no peptídicos.

Resumen de la invención

Teniendo en cuenta las limitaciones potenciales del uso de los péptidos cíclicos mencionados anteriormente como agentes terapéuticos candidatos, la presente invención describe moléculas químicas capaces de inhibir la fosforilación mediada por CK2 mediante interacción directa o indirecta con el sitio aceptador de fosfato sobre el sustrato, y provocar efecto citotóxico y antitumoral en modelos animales de cáncer.

Los compuestos químicos descritos aquí tienen una estructura química bien definida, lo que les permite lograr una o varias de las acciones siguientes:

A: provocar la unión de los compuestos al dominio de fosforilación o su medio en el sustrato CK2, bloqueando directa o indirectamente la unión de la enzima al sustrato.

B: provocar la unión de los compuestos al dominio de fosforilación del sustrato CK2, permitiendo la unión de la enzima pero bloqueando directa o indirectamente la transferencia del grupo fosfato a la serina fosfoaceptora.

C: provocar la unión de los compuestos a los sustratos de proteína CK2, provocando un cambio conformacional en el dominio de fosforilación, su medio, o ambos, de tal manera que bloquee directa o indirectamente la unión de CK2 o la transferencia del grupo fosfato a la serina fosfoaceptora.

Por lo tanto, estos compuestos se caracterizan principalmente por su capacidad de inhibir el evento bioquímico de la fosforilación mediada por CK2.

También se describen aquí moléculas químicas caracterizadas por una estructura química particular, definida por la ocurrencia, en cualquier parte de la molécula, de algunos elementos químicos unidos de manera consecutiva, con la hibridación electrónica indicada y agrupados en los siguientes cinco grupos estructurales:

I. N-[C(sp²)]_{1,2,3}-N

II. N-[C(sp²)]_{1,2}-[C(sp³)]_{1,2,3}-N

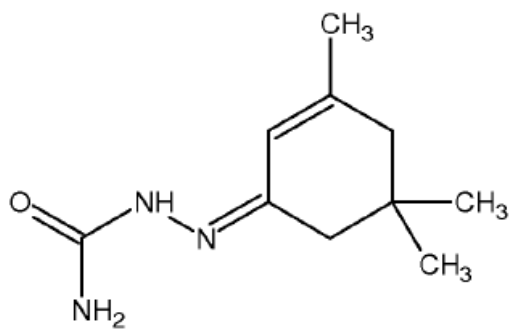
III. N-[C(sp³)]_{1,2,3}-N

IV. N-C(sp²)-[C(sp³)]_{1,2}-C(sp²)-N

V. N-C(sp³)-[C(sp²)]_{1,2}-C(sp³)-N

Compuestos que pertenecen a tales clases estructurales y reivindicadas en esta invención se muestran a continuación:

1.

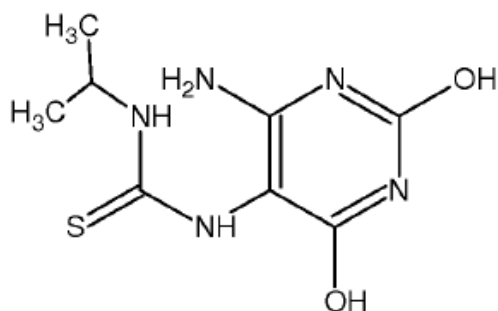


5

C₃₀₄₀₁

(1 Z)-3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona semicarbazona

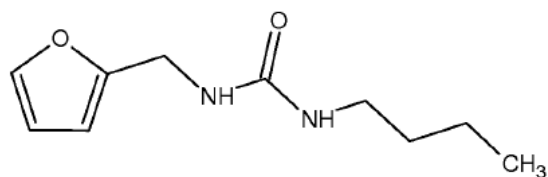
2.



C₃₀₄₀₂

N-(4-amino-2,6-dihidroxipirimidin-5-il)-N-isopropiltiurea

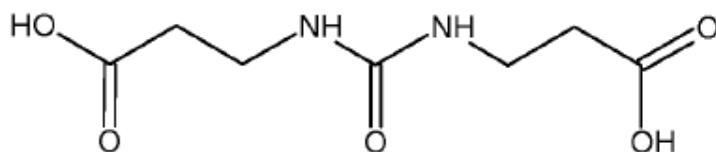
10 3.



C₃₀₄₀₃

N-butil-N-(2-furilmetil)urea

4.

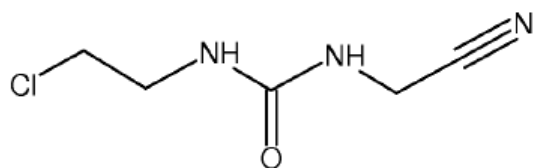


C₃₀₄₀₄

Ácido 3-([(2-carboxietil)amino]carbonyl)amino)propanoico

15

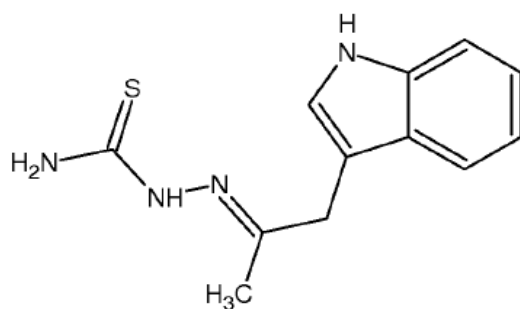
5.



C₃₀₄₀₅

1-(2-cloroetil)-3-(cianometil)urea

6.

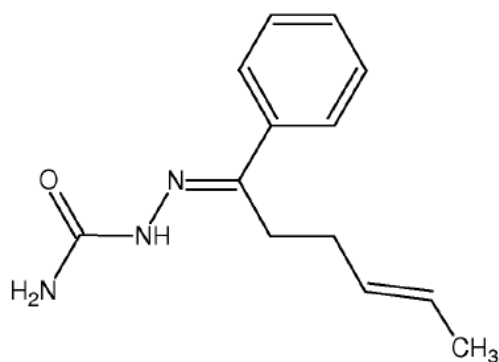


5

C₃₀₄₀₆

(2E)-1-(1 H-indol-3-il)acetona tiosemicarbazona

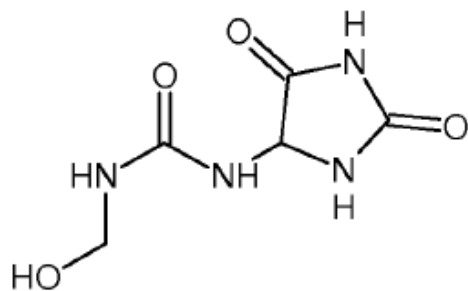
8.



C₃₀₄₀₈

(1E,4E)-1-fenilhex-4-en-1-ona semicarbazona

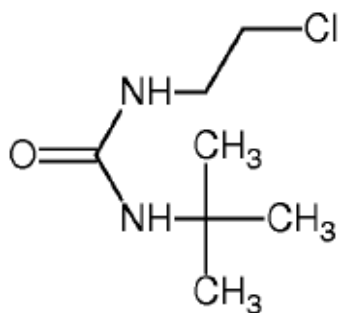
10 9.



C₃₀₄₀₉

1-(2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-3-(hidroximetil)urea

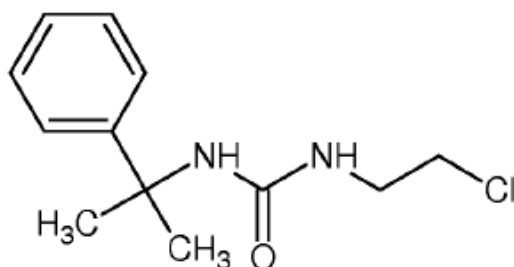
11.



C₃₀₄₁₁

1-tert-butil-3-(2-cloroetil)urea

12.

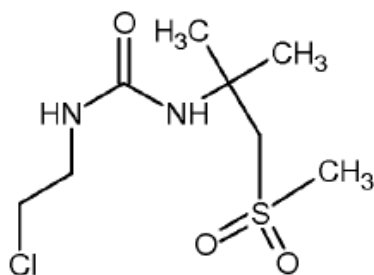


C₃₀₄₁₂

1-(2-cloroetil)-3-(1-metil-1-feniletil)urea

5

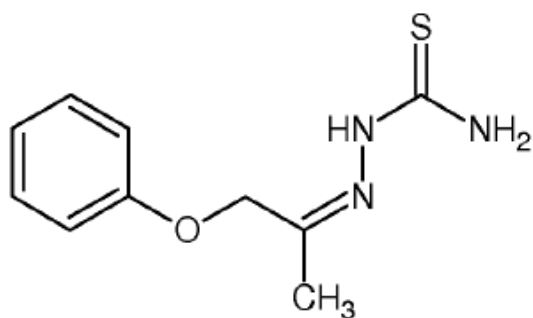
13.



C₃₀₄₁₃

1-(2-cloroetil)-3-[1,1-dimetil-2-(metilsulfonil)etil]urea

15.

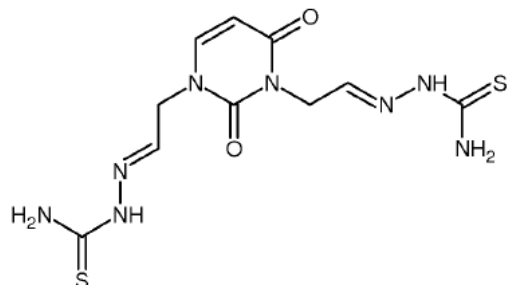


C₃₀₄₁₅

10

(2Z)-1-fenoxiacetona tiosemicarbazona

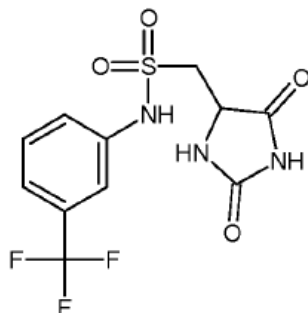
19.



C₃₁₄₁₉

(1 E, 1'E)-2,2'-(2,4-dioxopirimidin-1,3(2H,4H)-diil)diacetaldehído ditiosemicarbazona

5 30.



C₃₄₄₃₀

1-(2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-[3-(trifluorometil)fenil]metanosulfonamida

10

Las moléculas mencionadas anteriormente se describen por la función reivindicada a través del modelado molecular exhaustivo del sitio de fosforilación consenso (Meggio F., Pinna L.A. (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2. The FASEB J. 17:349-368), su validación mediante unión molecular para la enzima CK2, y análisis adicional mediante detección molecular masiva de una base de datos de diversidad química generada en nuestro laboratorio con un número aproximado de un millón doscientos mil compuestos

15

La invención también incluye cualquier variante homóloga de los compuestos descritos. Definiendo como variante homóloga, cualquier molécula de naturaleza química similar o diferente de aquellas descritas en el presente documento, pero con una estructura química que les permite alcanzar los mismos efectos, junto con el efecto inhibidor sobre la fosforilación mediada por CK2.

20

También se describe aquí una composición farmacéutica que comprende uno o más de los compuestos químicos, y/o sus sales farmacéuticamente aceptables, sola o junto con otros vehículos o aditivos farmacéuticamente permitidos. También se describe aquí el uso de compuestos químicos descritos, en la fabricación de medicamentos para la inhibición de la proliferación de células tumorales in vitro, in vivo o en dispositivos asociados al cuerpo, para el tratamiento del cáncer en organismos vivos y/u otras afecciones en las que la enzima CK2 puede tener una función patológica.

25

Las moléculas químicas descritas se definen por su capacidad para inhibir la fosforilación de la secuencia de aminoácidos mínima S/T-X-X-E/D, siendo X algún aminoácido preferiblemente diferente de Lisina o Arginina, y adicionalmente otras proteínas que no tienen dicha secuencia de consenso, unirse a este tipo de compuestos y tener su capacidad para inhibir la fosforilación mediada por CK2.

30

Para la definición de compuestos químicos descritos en esta invención, los autores han realizado el modelado molecular exhaustivo del sitio de fosforilación consenso, bien definido por esta enzima (Meggio F., Pinna L.A. (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2. The FASEB J. 17:349-368), su validación mediante unión molecular a la enzima CK2, y análisis adicional mediante detección molecular masiva de una base de datos de

diversidad química generada en nuestro laboratorio con un número aproximado de un millón dos cientos mil compuestos.

Todos los compuestos con valores de energía de unión calculados sobre el promedio, se seleccionan como positivos en la primera ronda, se someten a una segunda ronda de detección con valores de selección más restrictivos, y se analizan adicionalmente para ver las regularidades estructurales. La estructura química de los compuestos seleccionados en la segunda ronda de detección, se optimiza para alcanzar los valores más altos posibles para la energía de enlace calculada. Se sintetizan los compuestos resultantes, se purifican mediante Cromatografía Líquida de Alto Desempeño, se analizan mediante Espectroscopia Infrarroja, Espectrometría de Masas y Resonancia Magnética Nuclear y finalmente se evalúa su eficacia *in vitro* e *in vivo*. De acuerdo con la presente invención, los compuestos químicos descritos son igualmente eficientes en la capacidad de inhibir el evento de fosforilación mediado por CK2.

Los compuestos químicos descritos en esta invención provocan citotoxicidad en células tumorales humanas, en una forma dependiente de dosis, sin la ayuda de ningún agente de penetración celular. Dicha evidencia está de acuerdo con los hallazgos anteriores que muestran que las moléculas químicas son capaces de ser transportadas por la maquinaria celular, y alcanzar sus objetivos dentro de las células. (Meggio F, Pagano MA, et al. (2004) Inhibition of protein kinase CK2 by condensed polyphenolic derivatives. An *in vitro* and *in vivo* study. Biochemistry. 43:12931-12936).

Del mismo modo, es alentador encontrar valores IC₅₀ en los estudios de citotoxicidad *in vitro* en el rango nanomolar para estos compuestos químicos. Estos resultados muestran una actividad citotóxica mejorada de los compuestos con respecto descrito a los péptidos cíclicos reportados anteriormente que inhiben el dominio de fosforilación de CK2.

De acuerdo con los resultados *in vitro*, los compuestos químicos de esta invención tienen un efecto antitumoral potente cuando se administra localmente así como también sistémicamente. Igualmente se comprobó que los compuestos químicos de esta invención ejercen un efecto antitumoral en dosis tan bajas como de 0.5 y 2 mg/Kg, lo que representa una reducción de 10 a 20 veces de la dosis descrita para los péptidos cíclicos descritos previamente.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Efecto antitumoral de los compuestos químicos en modelos de tumor humano implantados en ratones.

Descripción detallada de las realizaciones particulares/Ejemplos.

La invención se explica a través de los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1: Selección de los compuestos mediante el modelado molecular *in silico*.

Mediante la utilización de un modelo computacional, desarrollado por detección virtual masiva, se seleccionan diversos compuestos con base en un alto valor para la energía de unión calculada del complejo de receptor-ligando (Tabla 1). Este valor energético aproximado se calcula teniendo en cuenta un análisis exhaustivo de la conformación y diversos componentes energéticos, utilizando un programa computacional desarrollado en nuestro laboratorio.

Tabla 1: Energías de interacción calculadas para el complejo de receptor-ligando.

Compuesto químico	Energía calculada - kJ mol ⁻¹	Compuesto químico	Energía calculada - kJ mol ⁻¹
Péptido P15	NA	C31421	34.6
C30401	37.5	C31422	34.6
C30402	38.2	C314 23	32.8
C30403	40.1	C31424	32.8
C30404	40.6	C32425	41.6
C30405	39.8	C33426	30
C30406	36.3	C33427	39.5
C30407	32.4	C34428	32.8

Compuesto químico	Energía calculada - kJ mol^{-1}	Compuesto químico	Energía calculada - kJ mol^{-1}
C30408	37.6	C34429	31.4
C30409	41.2	C34430	32.6
C30410	40.7	C34431	31.4
C30411	38.2	C34432	31.6
C30412	35.5	C34433	34.4
C30413	32.6	C34434	35.1
C30414	30.1	C34435	34.8
C30415	34.7	C34436	34.1
C31416	38	C34437	33.8
C31417	32.1	C34438	30.9
C31418	32.6	C34439	40.6
C31419	31.4	C34440	38.9
C31420	30		

Ejemplo 2: Efecto de los compuestos químicos descritos en la fosforilación de un sustrato CK2 típico.

El ensayo consiste en llevar a cabo una reacción de fosforilación in vitro, utilizando como sustrato la oncoproteína E7 del Virus del Papiloma Humano tipo 16 (VHP-16) expresada en E. coli como una proteína de fusión de Glutación S-Transferasa (GST). El E7-GST resultante luego se purifica mediante cromatografía de afinidad de Glutación-Sefarosa (Pharmacia). Antes de la reacción enzimática se preincuba E7-GST una hora a 37° C, con diferentes concentraciones de los compuestos químicos. La reacción se lleva a cabo en una mezcla que consiste en 50 μl de regulador Tris: HCL 25 mM pH 7,5, 1 μCi de ^{32}P - γATP , ATP 100 μM , resina que contiene 40 μl de E7-GST, NaCl 0.2 M, MgCl 10 mM y 1 unidad de la enzima CK2 (Promega), lo que permite proceder durante 40 minutos a 37° C. Después de la reacción, la resina se lava tres veces con 0.5 ml de regulador de reacción y finalmente se analiza el nivel de fosforilación de GST-E7 en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (PAGE). La visualización de la proteína fosforilada se lleva a cabo al exponer películas sensibles a rayos X al gel PAGE seco y se realiza cuantificación mediante análisis de densitometría de películas. Se estiman los valores IC50 utilizando cada curva de dosificación-efecto. Los valores IC50 se consideran como la concentración inhibidora que afecta el 50% de la actividad de enzima. En paralelo, se incluye un experimento de control como una comparación, que ensaya el péptido cíclico P15, reportado antes como inhibidor del sitio de fosforilación de sustrato CK2, en las mismas condiciones.

Los datos de la Tabla 2 indican que los compuestos químicos descritos aquí son inhibidores efectivos de un sustrato CK2 típico, según se considera partir de los valores IC50. Un hecho notable es darse cuenta de la más alta capacidad inhibidora de los compuestos químicos en comparación con el péptido cíclico reportado anteriormente, sólo se activa en el rango micromolar.

Tabla 2: Efecto inhibidor sobre un sustrato de CK2 típico

Compuesto químico	Concentración inhibidora 50 (IC50) nM	Compuesto químico	Concentración inhibidora 50 (IC50) nM
Péptido P15	2 000 $\pm$ 20	C31421	30 $\pm$ 8
C30401	26 $\pm$ 11	C31422	24 $\pm$ 5
C30402	30 $\pm$ 5	C314 23	26 $\pm$ 8
C30403	34 $\pm$ 9	C31424	32 $\pm$ 13

Compuesto químico	Concentración inhibidora 50 (IC50) nM	Compuesto químico	Concentración inhibidora 50 (IC50) nM
C30404	20 ± 8	C32425	35 ± 3
C30405	27 ± 10	C33426	29 ± 8
C30406	32 ± 7	C33427	31 ± 7
C30407	22 ± 10	C34428	25 ± 7
C30408	29 ± 2	C34429	21 ± 12
C30409	31 ± 6	C34430	30 ± 4
C30410	40 ± 9	C34431	32 ± 6
C30411	27 ± 10	C34432	29 ± 7
C30412	30 ± 3	C34433	26 ± 10
C30413	24 ± 9	C34434	28 ± 5
C30414	23 ± 9	C34435	34 ± 3
C30415	33 ± 8	C34436	30 ± 2
C31416	39 ± 6	C34437	27 ± 4
C31417	28 ± 11	C34438	31 ± 1
C31418	32 ± 5	C34439	33 ± 5
C31419	30 ± 4	C34440	26 ± 4
C31420	25 ± 7		

Ejemplo 3: Efecto de los compuesto químicos descritos sobre la fosforilación del sitio de consenso CK2.

El ensayo consiste en llevar a cabo una reacción de fosforilación in vitro, utilizando como el sustrato la secuencia RRREETEEE ampliamente aceptada como un dominio de fosforilación de consenso para los sustratos CK2.

- 5 Antes de la reacción enzimática se preincuba el péptido de sustrato una hora a 37° C, con diferentes concentraciones de compuestos químicos. La reacción se lleva a cabo en una mezcla que consiste de 50 µl de regulador Tris: HCL 25 mM pH 7.5, 1 µCi de ³²P-γATP, 100 µM ATP, 40 µl de resina que contiene E7-GST, NaCl 0.2 M, MgCl 10 mM y 1 unidad de la enzima CK2 (Promega), lo que permite proceder durante 10 minutos a 37° C.
- 10 Después de la reacción se aplican 5 µl de la mezcla de reacción a un filtro de papel Whatman PE-81 y se lavan cuatro veces con H₃PO₄ 10 mM, finalmente se mide la radioactividad asociada al papel y se correlaciona directamente el valor cpm para cada muestra con la actividad enzimática CK2.

Se estiman los valores IC50 utilizando cada curva de dosificación-efecto. Los valores IC50 se consideran como la concentración inhibidora que afecta el 50% de la actividad de enzima. En paralelo se incluye un experimento de control como una comparación, que ensaya en las mismas condiciones el péptido P15 cíclico reportado antes como inhibidor para el sitio de fosforilación de sustrato CK2.

15

Los datos de la Tabla 3 indican que los compuestos químicos descritos aquí son inhibidores efectivos de un sustrato CK2 típico, según se considera a partir de los valores IC50. Un hecho notable es darse cuenta de la más alta capacidad inhibidora de los compuestos químicos en comparación con el péptido cíclico reportado anteriormente, sólo se activa en el rango micromolar.

Tabla 3: Efecto inhibitorio sobre la secuencia de sustrato de consenso optimizada CK2

Compuesto químico	Concentración inhibitoria 50 (IC50) nM	Compuesto químico	Concentración inhibitoria 50 (IC50) nM
Péptido P15	5 000 ± 162	C31421	50 ± 8
C30401	62 ± 11	C31422	74 ± 5
C30402	74 ± 7	C31423	76 ± 4
C30403	58 ± 9	C31424	62 ± 1
C30404	61 ± 8	C32425	65 ± 13
C30405	57 ± 10	C33426	79 ± 9
C30406	60 ± 7	C33427	51 ± 7
C30407	73 ± 11	C34428	65 ± 10
C30408	79 ± 5	C34429	61 ± 4
C30409	55 ± 6	C34430	70 ± 4
C30410	54 ± 7	C34431	55 ± 3
C30411	66 ± 12	C34432	67 ± 7
C30412	71 ± 5	C34433	76 ± 8
C30413	64 ± 11	C34434	78 ± 1
C30414	68 ± 9	C34435	64 ± 6
C30415	72 ± 10	C34436	66 ± 2
C31416	69 ± 6	C34437	71 ± 9
C31417	78 ± 11	C34438	81 ± 7
C31418	72 ± 5	C34439	63 ± 12
C31419	60 ± 8	C34440	56 ± 4
C31420	55 ± 11		

Ejemplo 4: Efecto de los compuestos químicos descritos aquí sobre las células tumorales humanas.

5 Las células H-125 de un carcinoma de pulmón de células macrocíticas humanas se sumergen en placas de 96 pozos (Costar) a una densidad de 2×10^4 células/ml en medio Dulbecco (DMEM) (Gibco) y complementado con Suero Fetal Bovino (Gibco). 24 horas más tarde, se agregan los compuestos químicos descritos aquí a los medios cultivados en un rango entre 0.5 y 100 nM, incubando la mezcla durante 72 h a 37° C en 5% de CO₂, al final se agregan 20 µl de una solución MTS 1.90 ml/mg. Las placas se mantienen 1 hora adicional en las mismas condiciones de incubación y se lee la absorbancia a 492 nm. Los resultados se evalúan como porcentaje de crecimiento con controles sin ningún compuesto, y se estiman los valores IC50 utilizando cada curva de dosificación-efecto. Los valores IC50 se consideran como la concentración inhibitoria que afecta el 50% de la actividad de enzima. En paralelo se incluye un experimento de control como una comparación, que ensaya en las mismas condiciones el péptido P15 cíclico reportado antes como inhibidor para el sitio de fosforilación de sustrato CK2.

15 Los datos de la Tabla 4 indican que los compuestos químicos descritos en este documento tienen un efecto citotóxico potente in vitro sobre células tumorales humanas cultivadas, según se considere a partir de los valores

IC50. Un hecho notable es darse cuenta de la capacidad inhibidora más alta de los compuestos químicos en comparación con el péptido cíclico se informó anteriormente, sólo se activa en el rango micromolar.

Tabla 4: Efecto citotóxico sobre células de tumor humanas cultivadas

Compuesto químico	Concentración inhibidora 50 (IC50) nM	Compuesto químico	Concentración inhibidora 50 (IC50) nM
Péptido P15	70 000 ± 562	C31421	120 ± 18
C30401	103 ± 21	C31422	114 ± 5
C30402	98 ± 7	C314 23	106 ± 9
C30403	128 ± 9	C31424	162 ± 11
C30404	115 ± 18	C32425	115 ± 12
C30405	104 ± 12	C33426	109 ± 19
C30406	97 ± 17	C33427	151 ± 7
C30407	103 ± 11	C34428	165 ± 12
C30408	119 ± 8	C34429	131 ± 4
C30409	104 ± 6	C34430	140 ± 14
C30410	114 ± 7	C34431	155 ± 23
C30411	126 ± 15	C34432	127 ± 7
C30412	91 ± 15	C34433	116 ± 18
C30413	130 ± 11	C34434	108 ± 21
C30414	118 ± 9	C34435	124 ± 16
C30415	112 ± 10	C34436	116 ± 22
C31416	109 ± 6	C34437	131 ± 9
C31417	118 ± 21	C34438	111 ± 17
C31418	123 ± 15	C34439	123 ± 25
C31419	132 ± 18	C34440	136 ± 32
C31420	125 ± 10		

- 5 Ejemplo 5: Efecto antitumoral de los compuestos químicos de la invención en modelos de tumores humanos implantados en modelos de ratones sin pelo implantados.

10 Se utilizan ratones BalbC hembras sin pelo entre 6 a 8 semanas de edad para este ensayo. Para el implante del tumor en este modelo 5 000 000 de células H-125, suspendidas en 250 µl de PBS se inyectan en la región dorsal de los animales. Una vez los tumores son palpables con un volumen aproximado de 50 mm³, se realiza una administración diaria directa de 200 µg de compuestos C32425, C33426 y C33427 durante 5 días. Como se muestra en la Figura 1, la administración de los compuestos químicos resulta en una respuesta antitumoral significativa. Dichos resultados indican que los compuestos químicos que inhiben la fosforilación mediada por CK2 son capaces de provocar respuesta antitumoral en un modelo pertinente para la Oncología Experimental.

Reivindicaciones

1. Un compuesto químico que bloquea la fosforilación mediada por Quinasa de Caseína 2 (CK2), para uso como un medicamento,

5 en donde el compuesto se selecciona de: (1Z)-3,5,5- trimetilcicloex-2-en-1-ona semicarbazona, N-(4-amino-2, 6-dihidroxipirimidin-5-il)-N'-isopropiltiurea, ácido N-butil-N'-(2-furilmetil)urea, 3-({[2-carboxietil]amino} carbonil}amino)propanoico, 1-(2-cloroetil)-3- (cianometil)urea, (2E)-1-(1H-indol-3-il)acetona tiosemicarbazona, (1E,4E)-1- fenilhex-4-en-1-ona semicarbazona, 1-(2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-3- (hidroximetil)urea, 1-tert-butil-3-(2-cloroetil)urea, 1-(2-cloroetil)-3-(1-metil-1-feniletil)urea, 1-(2-cloroetil)-3-[1, 1-dimetil-2- (metilsulfonil)etil]urea, (1E, 1E')-2,2'-(2,4-dioxopirimidin-1,3(2H,4H)diil)diacetaldehído ditiosemicarbazona, y 1-(2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N[3-(trifluorometil)fenil]metanosulfonamida.

15 2. Una composición farmacéutica para uso en un método de tratamiento de cáncer, que comprende un compuesto químico que bloquea la fosforilación mediada por Quinasa de Caseína 2 (CK2), seleccionado de (1Z)-3,5,5-trimetilcicloex-2-en-1-ona semicarbazona, N-(4-amino-2,6-dihidroxipirimidin-5-il)-N'-isopropiltiurea, ácido N-butil-N'-(2-furilmetil)urea, 3-({[2-carboxietil]amino} carbonil}amino)propanoico, 1-(2-cloroetil)-3- (cianometil)urea, (2E)-1-(1H-indol-3-il)acetona tiosemicarbazona, (1E,4E)-1- fenilhex-4-en-1-ona semicarbazona, 1-(2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-3- (hidroximetil)urea, 1-tert-butil-3-(2-cloroetil)urea, 1-(2-cloroetil)-3-(1- metil-1-feniletil)urea, 1-(2-cloroetil)-3-[1,1-dimetil-2- (metilsulfonil)etil]urea, (2Z)-1-fenoxiacetona tiosemicarbazona, (1E,1E')-2,2'-(2,4-dioxopirimidin-1,3(2H,4H)-diil)diacetaldehído ditiosemicarbazona, y 1-(2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-[3-(trifluorometil)fenil]metanosulfonamida, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con otros vehículos o aditivos farmacéuticamente permitidos.

20 3. Un compuesto químico que bloquea la fosforilación mediada por Quinasa de Caseína 2 (CK2), seleccionado de (1Z)-3,5,5- trimetilcicloex-2-en-1-ona semicarbazona, N-(4-amino-2, 6-dihidroxipirimidin-5-il)-N'-isopropiltiurea, ácido N-butil-N'-(2-furilmetil)urea, ácido 3-({[2-carboxietil]amino}carbonil}amino)propanoico, 1-(2-cloroetil)-3- (cianometil)urea, (2.E)-1-(1H-indol-3-il)acetona tiosemicarbazona, (1E,4.E)-1-fenilhex-4-en-1-ona semicarbazona, 1-(2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-3- (hidroximetil)urea, 1-tert-butil-3-(2-cloroetil)urea, 1-(2-cloroetil)-3-(1- metil-1-feniletil)urea, 1-(2-cloroetil)-3-[1, 1-dimetil-2- (metilsulfonil)etil]urea, (2Z)-1-fenoxiacetona tiosemicarbazona, (1E,1E')-2,2'-(2,4-dioxopirimidin-1,3(2H,4H)-diil)diacetaldehído ditiosemicarbazona, y 1-(2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-[3-(trifluorometil)fenil]metanosulfonamida, para uso en un método de tratamiento del cáncer.

Fig 1.

