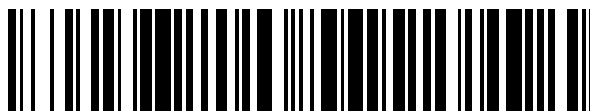


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 820**

51 Int. Cl.:

C07D 209/38 (2006.01)

A61K 31/4155 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 403/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2011** **E 11739972 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015** **EP 2531488**

54 Título: **Derivados de indirubin-3'-oxima como potentes inhibidores de la cinasa dependientes de ciclina**

30 Prioridad:

05.02.2010 KR 20100010715

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

08.03.2016

73 Titular/es:

ANYGEN CO., LTD (100.0%)
Rm. 301C Nano Bio Research Center, San 109
Samtae-ri, Nam-myun
Jangseong-gun, Jeollanam-do 515-893, KR

72 Inventor/es:

KIM, YONG-CHUL;
KIM, JAE-IL;
BAN, SOO-HO;
JEONG, SOON-YOUNG;
CHOI, SOO-JEONG y
LEE, JUNG-EUN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 562 820 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

Derivados de indirubin-3'-oxima como potentes inhibidores de la cinasa dependientes de ciclina

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un derivado de indirubin-3'-oxima como inhibidor potente de cinasas dependientes de ciclina con actividad anticancerosa. Más particularmente, la presente invención se refiere a un derivado de indirubin-3'-oxima como inhibidor potente de cinasas dependientes de ciclina que tiene actividad anticancerosa contra células de cáncer de pulmón humano, células de fibrosarcoma humano, células de cáncer de colon humano, células de leucemia humana, células de cáncer de estómago humano, células de cáncer nasofaríngeo humano y/o células de cáncer de mama humano.

15 Técnica anterior

Las cinasas dependientes de ciclina (CDK) pertenecen a un grupo de serina/treonina cinasas implicadas en la regulación de la progresión del ciclo celular, la función neuronal, la diferenciación y la apoptosis. Su actividad está estrechamente regulada por múltiples mecanismos, incluyendo la unión a las correspondientes ciclinas cuyo nivel de expresión oscila a través de las diferentes fases del ciclo celular. Durante cada etapa del ciclo celular a través de las fases G1, S, G2, M se activan diferentes complejos de CDK/ciclina. La fosforilación secuencial de la proteína del retinoblastoma (pRb) por la CDK4/ciclina D, CDK6/ciclina D en la fase G1 temprana y la CDK2/ciclina E en la fase G1 tardía causa la liberación de E2F, proteínas del factor de transcripción. A su vez, las proteínas E2F conducen a la activación de la transcripción de un conjunto de genes necesarios para entrar en la fase S del ciclo celular. La CDK2 es activada posteriormente por la ciclina A durante los estadios tardíos de la replicación del ADN, la fase S, y estimula la desactivación de E2F en el momento adecuado para prevenir la apoptosis desencadenada por la actividad persistente de E2F. Por último, se piensa que CDK1 en complejo con la ciclina A o B desempeña funciones en la regulación del punto de comprobación G2/M y dirigiendo a las células a través de la mitosis.

Además del control del ciclo celular, se han determinado otras funciones para CDK2, 7, 8 y 9. Por ejemplo, la CDK2/Ciclina E es importante para la vía de respuesta del daño del ADN mediada por p53 y CDK7, 8 y 9 están implicadas en la regulación de la iniciación y la elongación de la transcripción mediante fosforilación de la ADN polimerasa. Por tanto, las CDK afectan al crecimiento y la supervivencia celular a través de diferentes mecanismos y la regulación adecuada de la actividad de CDK es importante para varios procesos celulares. Ahora se reconoce que en muchos tumores se produce alteración de la regulación de las CDK por la elevada expresión anormal de las ciclinas, tales como la ciclina D y la ciclina E, o mutación. Por ejemplo, la expresión y la actividad catalítica de los complejos de CDK2/ciclina E están aumentadas en los cánceres colorrectal, de ovarios, de mama y de próstata, y la expresión elevada de la ciclina E en los tumores primarios se correlaciona con tasas de supervivencia malas para los pacientes de cáncer de mama. En algunos casos, adenocarcinoma de próstata y cáncer de pulmón, también se ha observado expresión anormal de los complejos de CDK1/ciclina B.

Aunque en un informe se ha notificado que la CDK2 puede no ser necesaria para la progresión del ciclo celular y la proliferación, en informes recientes se ha sugerido que los melanocitos y los hepatocitos pueden depender de la CDK2 para la proliferación y la supervivencia. Asimismo, en una investigación se ha notificado que la depleción simultánea de CDK1 y CDK2 proporciona una mayor eficacia en la antiproliferación de las líneas celulares tumorales en comparación con apuntar a CDK1 o CDK2 de forma individual. Además, pruebas emergentes indican que determinadas células tumorales pueden requerir CDK específicas de la interfase para la proliferación. Por tanto, la inhibición de las CDK puede proporcionar una estrategia eficaz para controlar el crecimiento tumoral como dianas atractivas para la terapia del cáncer.

Hasta la fecha, hay una serie de inhibidores de CDK de molécula pequeña actualmente en ensayos clínicos. Estos inhibidores son heterociclos pequeños y planos que actúan por competición con el ATP en el sitio de unión al ATP de la cinasa. Entre ellos, el flavopiridol fue el primer inhibidor de CDK en entrar en evaluaciones clínicas. La R-roscovitina (análogo de purinas trisustituido) y BMS-387032 (aminotiazol) son selectivos de CDK2/ciclina E y PD-0332991 (piridopirimidina) es altamente selectivo de CDK4/ciclina D y CDK6/ciclina D. Se ha investigado la indirubina, un almacén de bis-indol y sus derivados, con intereses considerables como inhibidores potentes dirigidos a importantes cinasas proteicas tales como CDK, GSK-3B, y aurora cinasas.

En el documento WO 2005/070416 A1, los inventores de la presente solicitud han divulgado "derivados de indirubina que tienen propiedad anticancerosa contra la línea celular cancerosa humana". En esta divulgación, se ha divulgado derivados de indirubina que tienen propiedad anticancerosa mediante la inhibición de la proliferación celular como la línea celular cancerosa humana. Entre los derivados de indirubina divulgados, la 5'-bromo-5-nitro-indirubin-3'-oxima mostró los efectos antiproliferativos más potentes ($CI_{50} = 0,79-2,9 \mu M$) contra varias líneas celulares cancerosas. No obstante, no se ha realizado la sustitución adicional de radicales en la posición 5' en el esqueleto de la indirubina, así como tampoco se ha medido la actividad anticancerosa con respecto a estos compuestos. Adicionalmente, no se ha producido ningún informe sobre la síntesis y evaluaciones biológicas que exploran el efecto de varias sustituciones en la posición 5' del esqueleto de indirubina.

El documento WO 99/62503 describe el uso de derivados de bisindol indigoides para la fabricación de un medicamento para inhibir las cinasas dependientes de ciclina, en particular CDK 1, CDK 2, CDK 4 y CDK 5.

Beauchard et al. (Bioorganic & Medicinal Chemistry; 17; (2009); 6257 – 6263) describen la síntesis de nuevos derivados de bisindol 5,7-disustituídos o 6-sustituídos. Se ha comunicado que los derivados de 6-Nitro-3'-N-oxima-indirubina y 5-amino-3'-N-oxima-indirubina exhibían actividad inhibitoria en un orden submicromolar contra CDK1/ciclina B, CK1 y GSK3.

Beauchard et al. (Bioorganic & Medicinal Chemistry; 14; (2006); 6434 – 6443) describen la síntesis y la evaluación de nuevas indirubinas 5-sustituídas.

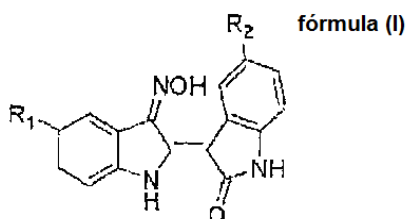
Moon et al. (Bioorganic & Medicinal Chemistry; 14; (2006); 237 – 246) describen que se ha sintetizado una serie de nuevos análogos de indirubina y se han evaluado las actividades inhibitorias de CDK2 y antiproliferativas.

Por otro lado, los inventores de la presente solicitud han descubierto que la sustitución adicional en la posición 5' es claramente favorable en comparación con el análogo de 5-nitro-indirubin-3'-oxima. Por tanto, los inventores de la presente solicitud han completado la invención mediante el diseño, la síntesis y la evaluación biológica, incluyendo la actividad inhibitoria de CDK, la actividad antiproliferativa y la actividad anticancerosas in vivo de nuevos análogos de indirubin-3'-oxima 5',5-sustituída.

Divulgación de la invención

Solución al problema

El objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto derivado de indirubin-3'-oxima como inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina con actividad anticancerosa representada por la fórmula (I)



en la que

R₁ se selecciona de F, Cl, OH o CH₃

R₂ se selecciona de F, Cl o NO₂

Adicionalmente, la presente invención proporciona un compuesto en el que comprende que R₁ es OH y R₂ es NO₂; un compuesto en el que comprende que R₁ es F y R₂ es NO₂.

Adicionalmente, la presente invención proporciona i) un compuesto en el que comprende que R₁ es OH y R₂ es Cl, ii) un compuesto en el que comprende que R₁ es OH y R₂ es F, iii) un compuesto en el que comprende que R₁ es Cl y R₂ es NO₂, y iv) un compuesto en el que comprende que R₁ es CH₃ y R₂ es NO₂.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de indirubin-3'-oxima mediante la fórmula (I) que tiene actividad anticancerosa contra la línea celular de cáncer de pulmón humano, la línea celular de fibrosarcoma humano, la línea celular de cáncer de colon humano, la línea celular de leucemia humana, la línea celular de cáncer de estómago humano, la línea celular de cáncer nasofaríngeo humano y/o la línea celular de cáncer de mama humano.

El objeto adicional de la presente invención es proporcionar una composición anticancerosa que comprende dicho compuesto derivado de indirubin-3'-oxima y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra una estructura de derivados de indirubina relacionados con la presente invención.

La FIG 2 muestra un modo de unión de 2 y 11b al sitio de unión al ATP de CDK2.

La FIG 2(a) muestra una red de puentes de hidrógeno (líneas discontinuas de color verde) entre 2 y la estructura de la cinasa. El modo de unión de 2 con CDK2 muestra tres puentes de hidrógeno con la región bisagra de CDK2, un puente de hidrógeno adicional entre el resto oxima y el oxígeno del carbonilo de Gln131. Y, asimismo, el grupo 5-nitro forma un puente de sal con las cadenas laterales de Lys33, Asp145. La FIG 2(b) muestra una superficie de van der Waals de CDK2 con 2 en la representación de CPK. El grupo 5'-Bromo se proyecta hacia el espacio acuoso externo del bolsillo de unión al ATP que presenta el resto de aminoácido con carga positiva, Lys89. La FIG 2(a)

muestra una red de puentes de hidrógeno (líneas discontinuas de color verde) entre 11b y la estructura de la cinasa. 11b forma un puente de hidrógeno adicional entre el grupo 5'-hidroxi y el ácido carboxílico de Asp86. Esto puede mejorar adicionalmente la actividad inhibidora de CDK2. La FIG 2(d) muestra una representación en la superficie molecular de CDK2 con 11b unido en el sitio de unión al ATP. Se muestran algunos aminoácidos importantes en la superficie de unión. El grupo 5'-hidroxi está apuntando fuera del bolsillo hacia el disolvente.

La FIG. 3 muestra un porcentaje de actividad de CDK1, CDK2 a 1 μ M de los derivados de indirubin-3'-oxima 5',5'-sustituidos. Se analiza una serie de derivados de indirubina a 1 μ M para determinar sus efectos de CDK1/ciclina B, CDK2/ciclina E, como se describe en la memoria descriptiva. El experimento también se ha realizado con 5-nitroindirubin-3'-oxima (1) para comparar.

La FIG. 4 muestra una detección selectiva del panel de cinasas de 11b, 12b a 10 μ M. Los compuestos 11b, 12b se analizan a la concentración de 10 μ M contra un panel más diverso de cinasas que comprende las tirosina cinasas receptoras y las serina/treonina cinasas, como se describe en la memoria descriptiva. 11b 1 μ M muestra una actividad inhibidora del 9 % contra TrkA y se calculan los valores de CI_{50} de 11b contra dos serina/treonina cinasas, Aurora A (1 μ M) e IKK β (10 μ M), y una tirosina cinasa receptora, TrkA (4 μ M) a partir de las curvas de respuesta a la dosis.

La FIG 5 muestra una inhibición del crecimiento del tumor xenoinjertado por 11b.

La FIG 5(a) muestra que se inyectó a ratas SA células RK3E-ras-Luc (5×10^6 / 100 μ l). Cuando el tumor alcanzó un tamaño de 5 mm, se inyectó a las ratas por vía intravenosa 11b (5 mg/kg) sin anestesia en días alternos un total de cinco veces. El tamaño del tumor se midió con compás como se describe en la memoria descriptiva. La FIG 5(b) muestra un tumor subcutáneo escindido representativo de ratas control y tratadas con 11b. La FIG 5(c) muestra un ensayo de obtención de imágenes de bioluminiscencia *in vivo* de las ratas control y tratadas con 11b.

La FIG 6 muestra una histología e inmunohistoquímica de tejido tumoral. Se inocularon células RK3E-ras-Luc por vía subcutánea en el flanco izquierdo de las ratas. Se inyectó 11b (5 mg/kg) por vía intravenosa en las ratas portadoras de tumores en días alternos, comenzando el día 5. Se sacrificó a las ratas el día 11. La FIG 6(a) muestra tinción de H y E de secciones tumorales (izquierda), ensayo TUNEL en secciones de parafina del tumor sólido (centro) y tinción inmunohistoquímica para PCNA (derecha), la FIG 6(b) muestra células positivas para el ensayo TUNEL, la FIG 6(c) muestra células positivas para la inmunotinción con PCNA. Las células se contaron por triplicado. Columnas, media; barras, DE.

Modo de la invención

Se diseñó una nueva serie de derivados de indirubin-3'-oxima con sustituciones combinadas en las posiciones 5' y 5 y se sintetizó para mejorar las potencias inhibidoras contra CDK2/ciclina E, una diana de los agentes anticancerosos, incluyendo derivados de indirubina. El modo de unión de los análogos 5'-sustituidos con OH o halógenos se predijo con un estudio de anclaje molecular en el sitio de unión al ATP de CDK2, que muestra las interacciones cruciales que podrían explicar la actividad inhibidora de CDK2 mejorada.

El análisis de la relación estructura-actividad mostró que se preferían los grupos OH y halógeno a los grupos donante de electrones, tales como CH₃ y OCH₃ en la posición 5'. Entre los derivados sintetizados, 5'-hidroxi-5-nitro-indirubin-3'-oxima (11b) y 5'-fluoro-5-nitro -indirubin-3'-oxima (13b) mostraron potentes actividades inhibidoras contra CDK2 con valores de CI_{50} de 1,9, 1,7 nM, respectivamente y efectos antiproliferativos contra varias líneas celulares cancerosas humanas con valores de CI_{50} en el intervalo de 0,2 ~ 3,3 μ M. Un estudio del perfil de la selectividad de la cinasa de 11b con 10 paneles diferentes de tirosina cinasa receptora y de serina/treonina cinasa dio lugar a una selectividad más de 500 veces mayor para la actividad inhibidora contra CDK. La actividad anticancerosa de 11b se confirmó adicionalmente en un modelo animal de xenoinjerto *in vivo* con administración i.v. de dosis de 5 mg/kg, que muestra una reducción del 84 % del volumen del tumor sin pérdida de peso corporal en comparación con los animales control. El mecanismo de la actividad antitumoral mediante el análisis histológico lo mostró los marcadores de apoptosis y proliferación, que aumentaban y disminuían, respectivamente.

Adicionalmente se puede considerar que otros análogos, tales como 5'-hidroxi-5-cloro-indirubin-3'-oxima (11a), 5'-hidroxi -5-fluoro-indirubin-3'-oxima (11c), 5'- cloro -5-nitro-indirubin-3'-oxima (12b) y 5'-metil-5-nitro-indirubin-3'-oxima (14b), agentes anticancerosos eficaces.

La presente invención se puede explicar más concretamente del siguiente modo.

Anclaje molecular para diseñar la estrategia

Para abordar el efecto antiproliferativo potenciado del compuesto **2** se realizó un estudio de anclaje molecular en el sitio de unión al ATP de CDK2 (FIG. 2) usando CDocker, un programa de anclaje dinámico molecular basado en CHARMm (Discovery Studio 2,0). La FIG 2(a) muestra que el nitrógeno en la posición 1', el oxígeno del carbonilo en la posición 2 y el nitrógeno en la posición 1 del compuesto **2** mantienen tres interacciones de unión de hidrógeno con los segmentos bisagra (Gln81, Leu83) del sitio de unión a ATP. Además, el grupo 3'-hidroxilo del resto oxima forma un Puente de hidrógeno con el carbonilo de la estructura de Gln131 y el grupo 5-nitro contribuye a un puente de sal con las cadenas laterales de Lys33, Asp145. La Fig 2(b) representa la superficie de unión con potencial electrostático en 4Å alrededor del ligando, **2** y el grupo 5'-Br podría proyectarse hacia el espacio acuoso externo del

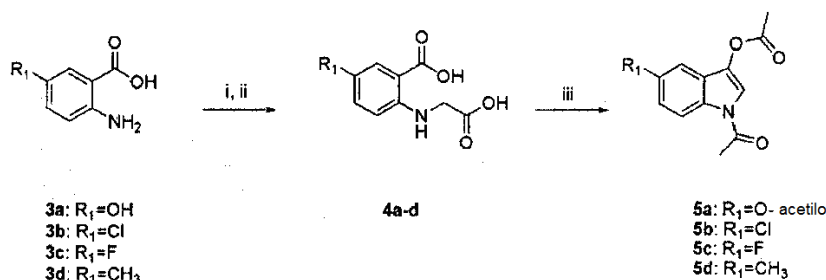
5

10

15

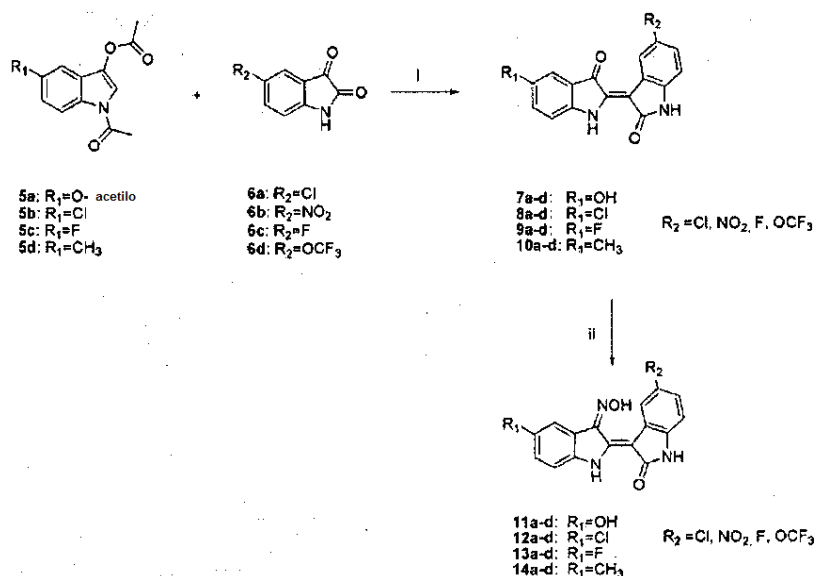
20

25

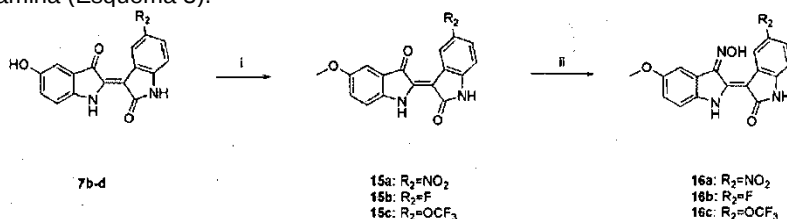


30

35



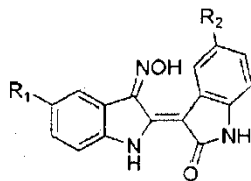
Los compuestos 5'-Metoxi-5-sustituida-3'-oxima 16a-c se sintetizaron a partir de los correspondientes derivados de 5'-hidroxi-5-sustituida 15a-c mediante metilación de los grupos hidroxilo fenólicos y la posterior reacción con hidroxilamina (Esquema 3).



Actividad inhibidora de CDK y perfil de selectividad de cinasa

Inicialmente se evaluaron las actividades inhibidoras de los derivados de 5',5-sustituida-indirubin-3'-oxima contra CDK1/ciclina B, CDK2/ciclina E a 1 μ M (FIG 3). La 5-nitroindirubin-3'-oxima 1 se analizó para la comparación de los efectos de las sustituciones en la posición 5'. Resultó que la actividad inhibidora y la selectividad de los compuestos por CDK2 sobre CDK1 dependían de los sustituyentes en 5' en la posición R1. En general, los derivados de indirubin-3'-oxima 5',5-sustituida presentaron potentes actividades inhibidoras contra CDK2 con una potencia inhibidora de más del 90 % a 1 μ M, a excepción de 12d, 16a-c. Especialmente, los análogos de 5'-OH, 11a-d mostraron la potencia inhibidora más alta contra tanto CDK1 como CDK2. Aunque el 5'-OH en la posición R₁ dio lugar a una disminución de la selectividad de CDK2 sobre CDK1, este resultado puede ser importante a la luz del concepto de que el inhibidor simultáneo contra CDK1 y CDK2 puede tener beneficios adicionales en términos de actividad anticancerosa, de acuerdo con el grupo de literaturas. Además, la sustitución del grupo 5'-hidroxilo mejoró la solubilidad en agua, que ha sido un inconveniente fundamental entre las propiedades físicoquímicas de los análogos de indirubina. Al contrario que los derivados de indirubin-3'-oxima 5'-OH-sustituida, los derivados de indirubin-3'-oxima 5'-cloro y 5'-fluoro sustituida 12a-d y 13a-d mantuvieron una potente actividad inhibidora de CDK2 con una selectividad 6 – 10 mayor sobre CDK1. Por ejemplo, la 5'-cloro-5-nitro-indirubin-3'-oxima 12b fue aproximadamente 8 veces más potente contra CDK2 que CDL1 (Tabla 1).

Tabla 1. Actividades inhibitoras de CDK2/ciclina E de los derivados de indirubin-3'-oxima 5',5-sustituida



Compuesto	R ₁	R ₂	Cl ₅₀ (nM) ^a
11a	OH	Cl	5,27
11b	OH	NO ₂	1,91 ^b
11c	OH	F	2,25
11d	OH	OCF ₃	8,32
12a	Cl	Cl	11,1
12b	Cl	NO ₂	23,5 ^b
12c	Cl	F	10,1
12d	Cl	OCF ₃	76,2
13a	F	Cl	8,01
13b	F	NO ₂	1,71
13c	F	F	1,83
13d	F	OCF ₃	60,3
14b	CH ₃	NO ₂	8,68
16a	OCH ₃	NO ₂	2.950
16b	OCH ₃	F	4.120
16c	OCH ₃	OCF ₃	8.620
1	H	NO ₂	7,35

Se analizó una serie de derivados de indirubina a diez concentraciones en el ensayo de CDK2/ciclina E cinasa, como se describe en la sección experimental. Los valores de Cl₅₀ se calcularon a partir de las curvas de respuesta a la dosis. Los valores de Cl₅₀ de 11b y 12b en el ensayo de CDK1/ciclina B cinasa son 13 nM y 195 nM, respectivamente.

La menor potencia de inhibición de CDK1 mediante halogenaciones en 5' podría avalarse adicionalmente con un informe de 5'-bromo-5-nitro-indirubin-3'-oxima, 2, que mostró disminución de la actividad inhibitora de DCK1 (IC₅₀ = 190 nM) en comparación con 5-nitro-indirubin-3'-oxima, 1. Entre la serie de compuestos con grupos donantes de electrones en la posición 5', 14b con 5'-CH₃ mantuvo una potente actividad inhibitora de CDK2 con una selectividad sobre CDK1 siete veces mayor. No obstante, los derivados sustituidos con 5'-OCH₃ (16a-c) mostraron ninguna o débil actividad inhibitora débil contra CDK1 y CDK2 a 1 μM.

Las relaciones estructura-actividad de los derivados de 5',5-indirubin-3'-oxima para sus actividades inhibitoras de CDK2 se analizaron con valores de Cl₅₀. (Tabla 1) La mayoría de los derivados mostraron potentes actividades inhibitoras con valores de Cl₅₀ de 1-70 nM, a excepción de los derivados de 5'-OCH₃ 16a-c. Con respecto a los efectos de los sustituyentes en 5' en la posición R₁, las actividades inhibitoras de CDK2 aumentaron en el siguiente orden -OCH₃ < -Cl < -H, -CH₃ < -OH, -F. Por ejemplo, los compuestos de 5'-cloro-sustituida-indirubin-3'-oxima 12a-d mostraron una actividad inhibitora de CDK2 diez veces menor (Cl₅₀ = 10-76 nM) que los derivados de 5'-fluro-indirubin-3'-oxima 13a-c (Cl₅₀ = 1-8 nM). Un grupo donante de electrones, sustituyente 5'-OCH₃ (16a-c) mostró una actividad inhibitora de CDK2 espectacularmente reducida con valores de IC₅₀ de 2 - 8 μM, aunque otro grupo donante de electrones, indirubin-3'-oxima sustituida con 5'-CH₃, 14b, mostró un efecto inhibitor 270 veces mayor en comparación con 16b. En particular, los inhibidores de CDK2 más potentes 11b, 13b y 13c mostraron valores de Cl₅₀ de aproximadamente 2 nM contra CDK2 con una potencia aproximadamente 4 veces mayor que la 5'-no sustituida-5-nitro-indirubin-3'-oxima, 1 (Cl₅₀ = 7 nM). En el análisis del efecto de 5-sustituciones en la posición R₂ de los derivados de indirubin-3'-oxima, los grupos nitro y flúor fueron, en general, más favorables para la inhibición de CDK2 en lugar de otros sustituyentes en 5, tales como los grupos cloro o trifluorometoxi. En conjunto, los análogos de indirubin-3'-oxima con combinación de sustituyentes que proporcionan efectos electrónicos tales como OH y F en la posición 5' y NO₂ y F en la posición F mostraron una potente actividad inhibitora contra CDK2.

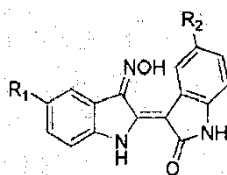
Los potentes y selectivos inhibidores de CDK2 representativos, 11b y 12b, se evaluaron adicionalmente contra un panel de cinasas más diverso que comprende tirosina cinasas receptoras y serina/treonina cinasas (FIG 4). 11b mostró una débil actividad inhibitora solo contra Aurora A, IKKβ y TrkA entre las cinasas analizadas y los valores de Cl₅₀ estaban en el intervalo de 1-10 μM. 12b mostraron actividades inhibitoras insignificantes contra todo el panel de cinasas analizado. Dado que los valores de Cl₅₀ de 11b y 12b contra CDK1 y 2 están en los intervalos

nanomolares bajos, el perfil de selectividad de la cinasa entre las serina/treonina cinasas y las tirosina cinasas receptoras analizadas en este estudio podrían ser significativamente favorables para CDK1 y CDK2.

Actividad antiproliferativa

Las actividades antiproliferativas de los derivados de indirubin-3'-oxima 5',5-sustituida contra varias líneas celulares cancerosas, A549, HT1080, HCT116, K562, SNU638, KB, MCF-7 se evaluaron con un ensayo SRB y los valores de IC_{50} de inhibición del crecimiento de células cancerosas se resumen en la Tabla 2. Se analizaron la 5'-Bromo-5-nitro-indirubin-3'-oxima (**2**) y la roscovitina junto con un control positivo en el ensayo.

Tabla 2. Actividades antiproliferativas de los derivados de indirubin-3'-oxima 5',5-sustituida en diferentes líneas celulares de cáncer humano



Compuesto	R ₁	R ₂	CI ₅₀ (μM)						
			A549 ^b	HT1080 ^c	HCT116 ^d	K562 ^e	SNU638 ^f	KB ^g	MCF-7 ^h
11a	OH	Cl	16,4	2,92	3,5	12,2	5,14	10,2	10,7
11b	OH	NO ₂	3,33	0,45	0,44	0,91	1,03	1,3	1,2
11c	OH	F	4,09	0,68	1,66	1,4	2,11	4,6	2,6
11d	OH	OCF ₃	16,9	2,28	2,25	5,9	2,96	5,8	4,2
12a	Cl	Cl	>20	12,2	1,86	17,2	2,57	11,9	6,1
12b	Cl	NO ₂	15,6	1,25	0,33	0,56	1,16	1,1	0,5
12c	Cl	F	18,9	3,62	1,7	14,7	2,28	3,6	3,5
12d	Cl	OCF ₃	>20	17,7	3,79	>20	2,71	2,8	4,2
13a	F	Cl	>20	5,33	3,3	7,14	6,32	9,1	7
13b	F	NO ₂	0,57	0,64	0,28	0,46	0,94	0,9	0,9
13c	F	F	10,3	8,6	13,5	15,9	2,23	13,2	6,57
13d	F	OCF ₃	19,9	3,95	1,5	1,5	1,89	3,8	4,1
14a	CH ₃	Cl	>20	>20	18,8	>20	12,7	5,18	8,79
14b	CH ₃	NO ₂	>20	3,92	1,41	0,8	1,06	2,1	1,06
14c	CH ₃	F	>20	>20	>20	>20	11,5	10,6	10,5
14d	CH ₃	OCF ₃	>20	>20	>20	>20	>20	8,13	7,3
16a	OCH ₃	NO ₂	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
16b	OCH ₃	F	6,71	4,84	3,59	5,29	13,6	>20	>20
16c	OCH ₃	OCF ₃	>20	>20	>20	>20	>20	20	13
2 ⁱ	Br	NO ₂	16,9	1,45	0,45	0,77	1,14	1,16	0,95
Roscovitina ⁱ			14,7	16,8	17,8	>20	9,77	30,1	14,7

a Se analizó una serie de derivados de indirubina a cinco concentraciones para determinar sus efectos sobre varias líneas celulares de cáncer humano usando el ensayo de SRB, como se describe en la Sección experimental. Los valores de IC_{50} (μM) se calcularon a partir de las curvas de respuesta a la dosis. ^b célula de cáncer de pulmón humano. ^c célula de fibrosarcoma humano. ^d célula de cáncer de colon humano. ^e célula de leucemia humana. ^f célula de cáncer de estómago humano. ^g célula de cáncer nasofaríngeo humano. ^h célula de cáncer de mama humano. ⁱ Los experimentos también se realizaron con **2** y roscovitina como control positivo.

Las actividades antiproliferativas de derivados de 5'-hidroxi **11a-d** se correlacionan bien con la potencia de sus actividades inhibitoras contra CDK2 en función de los sustituyentes en la posición 5 con el siguiente orden NO₂ > F > Cl, OCF₃. En particular, 5'-hidroxi-5-nitro-indirubin-3'-oxima **11b** mostró una actividad inhibitora similar o mejorada dependiendo de las células cancerosas en comparación con **2**, con valores de CI_{50} de ~0,4 μM frente a la línea celular HT1080 y HCT 116. Entre los compuestos co sustitución del grupo 5'-bromo de **2** por otros grupos halógenos tales como F y Cl, los análogos de 5-nitro **12b** y **13b** mostraron más eficacia que el compuesto 5'-bromo-5-nitro-indirubin-3'-oxima **2**, especialmente, contra la proliferación de células de cáncer de colon humano, HCT116, con ciclina D1 de regulación alterada, con valores de CI_{50} de aproximadamente 0,3 μM.

En particular, la 5'-fluoro-5-nitro-indirubin-3'-oxima **13b** mostró el espectro más amplio de potencia inhibitora contra todas las células cancerosas (CI_{50} = 0,28 ~ 0,94 μM) con la correlación de su potente actividad inhibitora de

CDK2. El compuesto 13b tiene una actividad antiproliferativa exclusiva con un valor de CI_{50} nanomolar contra las células de cáncer de pulmón humano, A549, en contraste con las actividades débiles de la mayoría de los demás derivados. No obstante, los derivados de indirubin-3'-oxima sustituidos con grupos donantes de electrones tales como 5'-CH₃, 5'-OCH₃, 14 y 16, eran inhibidores muy débiles contra la mayoría de las células cancerosas, a excepción de 5'-metil-5-nitro-3'-oxima, 14b, cuyas actividades antiproliferativas estaban en el intervalo de 0,8 ~ 1 μ M de los valores de CI_{50} . Con respecto al efecto de las sustituciones en la posición 5 (R₂), el grupo 5-NO₂ en combinación con 5'-OH, Cl, F, CH₃ mostró el efecto antiproliferativo más potente entre la serie de derivados 5',5-disustituidos. Este resultado concuerda con los resultados previamente publicados por los inventores²³ y avalados por el modo de unión hipotetizado de 2 y 11b, en el que la unión adicional con un puente de sal podría formarse entre el grupo 5-nitro y Asp145, Lys33 en el sitio de unión al ATP de CDK2. En el caso de los derivados de 5'-OCH₃, solo el análogo sustituido en 5-F 16b mostró una actividad antiproliferativa moderada, lo que indica que un mecanismo de acción diferente podría asociarse con este análogo. Los resultados combinados en este estudio sugieren un conocimiento importante de que los grupos 5'-hidroxilo o halógeno podrían ser favorables para inhibir la CDK y el crecimiento de las células cancerosas posiblemente formando una interacción de puentes de hidrógeno adicionales en el sitio de unión al ATP de CDK2.

Actividad anticancerosa in vivo de 11b

Para explorar los efectos del análogo de 5'-OH-5-nitro 11b *in vivo*, se usó como publicado por el grupo de los inventores un modelo animal de xenoinjerto tumoral de ratas Sprague Dawley (SD) en el que se transplantaron por vía subcutánea células de riñón de rata RK3E que alojan el gen k-ras y GFP/Luc. Cinco días después del trasplante, se administraron al animal 5 mg/kg de 11b i.v. en días alternos un total de cinco veces con control diario. El volumen del tumor disminuyó significativamente en aproximadamente un 84,3 % en comparación con los grupos control (FIG 5(a) y FIG 5(b)). No hubo diferencias significativas en el peso corporal durante la administración de 11b en comparación con el grupo control (datos no mostrados). Las imágenes de bioluminiscencia obtenidas el día 10 tras el tratamiento de 11b indicaron que la intensidad de la luminiscencia, un indicador del crecimiento tumoral, disminuía significativamente (FIG 5(c)).

El análisis histológico mostró que el tumor sólido control sin tratar pertenecía al carcinoma anaplásico indiferenciado que muestra muchas figuras mitóticas, necrosis multifocal y hemorragia. No obstante, el tumor tratado con 11b condujo a una extensa muerte celular (FIG 6(a), izquierda). Las células apoptóticas positivas en TUNEL aumentaron aproximadamente 6,0 veces en el tejido de los animales tratados con 11b en comparación con el tejido control (FIG 6(a) centro y FIG 6(b)). Por otro lado, el nivel de expresión de PCNA, un marcador de proliferación celular, disminuyó en los animales tratados con 11b en comparación con el control (FIG 6(a) derecha y FIG 6(c)). Estos resultados indican que 11b suprime el crecimiento tumoral mediante inhibición de la proliferación celular y activación de la apoptosis *in vivo*.

En resumen, se desarrollaron nuevos compuestos de 5',5-sustituida-indirubin-3'-oxima como potentes inhibidores contra CDK1 y 2 con actividades antiproliferativas en varias líneas de células cancerosas. Las actividades inhibitoras potenciadas de los derivados de indirubin-3'-oxima 5',5-sustituida, en comparación con indirubin-3'-oxima 5'-no sustituida, 1 podría interpretarse con un estudio de anclaje molecular en el sitio de unión al ATP de CDK2, lo que tiene como resultado la determinación de la proyección adicional de la molécula hacia la región accesible al disolvente y las interacciones como los residuos de aminoácidos presentados del bolsillo de unión al ATP ilustrado con el análogo 5'-hidroxi, 11b. Especialmente, los derivados sintetizados, 5'-hidroxi-5-nitro-indirubin-3'-oxima (11b) y 5'-fluoro-5-nitro -indirubin-3'-oxima (13b) eran potentes inhibidores de CDK2 con valores de CI_{50} de 1,71 nM y 1,91 nM, respectivamente, así como potentes agentes antiproliferativos contra varias líneas celulares cancerosas humanas con valores de CI_{50} en el intervalo de 0,2 ~ 3,3 μ M. El análisis de la relación estructura-actividad mostró que se preferían los grupos OH y halógeno a los grupos donante de electrones, tales como 5'-CH₃, 5'-OCH₃ en la posición 5'. Un análogo representativo, 5'-hidroxi-5-nitro-indirubin-3'-oxima (11b) mostró una selectividad de más de 500 veces la actividad inhibidora contra CD sobre el panel de cinasas seleccionadas y, también, actividades anticancerosas *in vivo* significativas. Podría esperarse que la información procedente de este estudio contribuya al desarrollo del diseño del fármaco basado en el inhibidor de CDK y las aplicaciones clínicas.

Adicionalmente se puede considerar que otros análogos, tales como 5'-hidroxi-5-cloro-indirubin-3'-oxima (11a), 5'-hidroxi -5-fluoro-indirubin-3'-oxima (11c), 5'- cloro -5-nitro-indirubin-3'-oxima (12b) y 5'-metil-5-nitro-indirubin-3'-oxima (14b), agentes anticancerosos eficaces.

La presente invención se puede explicar más concretamente mediante los ejemplos siguientes. No obstante, el alcance de la presente invención no debe interpretarse mediante los siguientes ejemplos limitantes.

Ejemplos

Química:

Los espectros de RMN de ^1H se determinaron con un espectrómetro JEOL JNM-LA 300WB a 300 MHz o un espectrómetro JEOL JNM-ECX 400P a 400 MHz, y los espectros se tomaron en CDCl_3 o $\text{DMSO}-d_6$ o acetona- d_6 . A menos que se indique lo contrario, los desplazamientos químicos se expresan como ppm campo debajo de tetrametilsilano interno o ppm relativas de DMSO (2,5 ppm), acetona (2,04 ppm). La espectroscopia de masas se llevó a cabo en electropulverización y los espectros de masas de alta resolución (m/z) se registraron en FAB, EI [JEOL: intervalo de masas 2600 uma, aceleración 10 kV] y ESI. El análisis de masas de alta resolución se realizó en el Korea Basic Science Institute (Daegu).

La pureza de todos los productos finales se determinó mediante HPLC (una pureza de al menos 95 % a menos que se indique lo contrario). La determinación de la pureza se realizó en un sistema de HPLC Shimadzu SCL-10A VP usando una columna analítica Shimadzu Shim-pack C18 (250 mm 4,6 mm, 5 μm , 100Å en sistemas de disolvente en gradiente lineal. El sistema de disolvente fue H_2O : CH_3CN = 65:35 to 5:95 en 30 minutos a un caudal = 1 ml/min. Los picos se detectaron mediante absorción UV usando un detector de matriz de diodos.

(Ejemplo 1) Preparación de *N,O*-diacetato de indoxilo 5-sustituido 5a-d

A una solución de ácido antranílico 5-sustituido (1,0 g, 6,45 mmol) en 50 ml de metanol se añadieron 0,5 ml de ácido acético, seguido de glicoxalato de etilo (1 ml, 9,7 mmol) y NaCNBH_3 (609,5 mg, 9,7 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, el metanol se eliminó mediante evaporación. El residuo se suspendió en solución de NH_4Cl saturada en agua y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron. El producto se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (CH_2Cl_2 : metanol = 30:1) y después este producto (1,4 g, 5,8 mmol) se hidrolizó en 25 ml de $\text{NaOH}(\text{ac.})$ 1 N y 10 ml de metanol. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y la solución resultante se acidificó mediante HCl 1N. El precipitado formado se recogió mediante filtración y se lavó con agua. Los compuestos diácido obtenidos **4a-d** (1,2 g, 4,97 mmol) se añadieron en anhídrido acético (15 ml) y Na_2CO_3 (1,3 g, 12,4 mmol). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 4 horas. El producto se extrajo con acetato de etilo y se lavó con agua. Los extractos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (hexano: acetato de etilo = 2:1).

Datos para diacetato de 1-acetil-1*H*-indol-3,5-diilo (5a)

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz, ppm, J en Hz) 8,46 (1H, d, J = 9,3 Hz), 7,76 (1H, s), 7,30 (1H, d, J = 2,4 Hz), 7,11 (1H, dd, J = 9,3, 2,4 Hz), 2,67 (3H, s), 2,36 (3H, s), 2,31 (3H, s). ESI $[\text{M}-\text{H}]^-$: 273,83.

Datos para acetato de 1-acetil-5-cloro-1*H*-indol-3-ilo (5b)

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, ppm, J en Hz) 8,40 (1H, d, J = 8,8 Hz), 7,75 (1H, s), 7,53 (1H, d, J = 2 Hz), 7,34 (1H, dd, J = 8,8, 2 Hz), 2,61 (3H, s), 2,39 (3H, s). ESI $[\text{M}-\text{H}]^-$: 249,83.

Datos para acetato de 1-acetil-5-fluoro-1*H*-indol-3-ilo (5c)

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, ppm, J en Hz) 8,42 (1H, m), 7,75 (1H, s), 7,19 (1H, dd, J = 8,2, 2,4 Hz), 7,10 (1H, td, J = 8,8, 2,4 Hz), 2,59 (3H, s), 2,37 (3H, s). ESI $[\text{M}-\text{H}]^-$: 233,88.

Datos para acetato de 1-acetil-5-metil-1*H*-indol-3-ilo (5d)

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, ppm, J en Hz) 8,31 (1H, d, J = 7,6 Hz), 7,65 (1H, s), 7,31 (1H, s), 7,19 (1H, d, J = 7,6 Hz), 2,57 (3H, s), 2,44 (3H, s), 2,36 (3H, s). ESI $[\text{M}-\text{H}]^-$: 229,80.

(Ejemplo 2) Preparación de derivados de indirubin-3'-oxima 5',5-substituida 11 - 14

A una solución de análogos de isatina (77 mg, 0,425 mmol) en metanol (5 ml) se añadió diacetato de indoxi-*N,O* 5-sustituido (100 mg, 0,425 mmol) y la mezcla se agitó durante 5 minutos. Se añadió Na_2CO_3 anhidro (112,5 mg, 1,06 mmol) y la agitación continuó durante 3 horas a temperatura ambiente. El precipitado oscuro se filtró y se lavó con agua fría y se secó a presión reducida, dando derivados de indirubina 5,5-substituida, **7 - 10**. El derivado de indirubina adecuado (10 mg, 0,032 mmol) se disolvió en piridina (0,3 ml) y se añadió clorhidrato de hidroxilamina (6,6 mg, 0,095 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo a 120 °C durante 2 horas. Después de enfriar, el producto se acidificó con HCl 1N. La precipitación se filtró y se lavó con agua, para dar cuantitativamente la correspondiente 3'-oxima de forma selectiva en una forma (2'*Z*, 3'*E*). El producto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (cloroformo: Metanol: 20:1).

Datos para (2'*Z*, 3'*E*)-5'-hidroxi-5-cloro-indirubin-3'-oxima (11a)

RMN de ^1H NMR (DMSO , 400 MHz, ppm, J en Hz) 11,71 (1H, s, N-H), 10,78 (1H, s, N'-H), 9,27 (1H, s, O-H), 8,59 (1H, d, J = 2 Hz, H-4), 7,74 (1H, d, J = 2 Hz, H-4'), 7,24 (1H, d, J = 8,4 Hz, H-7), 7,11 (1H, dd, J = 8, 2 Hz, H-6'),

6,87 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6), 6,85 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-7'). HRMS (EI) $[M]^+(C_{16}H_{10}ClN_3O_3)$: calcd. 327,0411 hallado 327,0408. Pureza 92 %.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-hidroxi-5-nitro-indirubin-3'-oxima (11b)

RMN de 1H NMR (DMSO, 300 MHz, ppm, J en Hz) 13,87 (1H, s, NOH), 11,78 (1H, s, N-H), 11,35 (1H, s, N'-H), 9,41 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H-4), 9,32 (1H, s, O-H), 8,05 (1H, dd, $J = 11,6$, 2,8 Hz, H-6), 7,76 (1H, d, $J = 3,2$ Hz, H-4'), 7,29 (1H, d, $J = 11,6$ Hz, H-7), 7,04 (1H, d, $J = 11,2$ Hz, H-7'), 6,86 (1H, dd, $J = 11,2$, 3,2 Hz, H-6'). HRMS (EI) $[M]^+(C_{16}H_{10}N_4O_5)$: calcd. 338,0651 hallado 338,0648.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-hidroxi-5-fluoro-indirubin-3'-oxima (11c)

RMN de 1H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm, J en Hz) 11,69 (1H, s, N-H), 10,66 (1H, s, N'-H), 9,25 (1H, s, O-H), 8,42 (1H, dd, $J = 11,4$, 2,8 Hz, H-6), 7,73 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-4'), 7,24 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6'), 6,81 – 6,99 (3H, m, H-7', H-4, H-7). HRMS (EI) $[M]^+(C_{16}H_{10}FN_3O_3)$: calcd. 311,0706 hallado 311,0707. Pureza 93%.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-hidroxi-5-trifluorometoxi-indirubin-3'-oxima (11d)

RMN de 1H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm, J en Hz) 11,70 (1H, s, N-H), 10,78 (1H, s, N'-H), 9,22 (1H, s, O-H), 8,50 (1H, s, H-4), 7,70 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-4'), 7,21 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-7'), 7,03 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7), 6,88 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6), 6,80 (1H, dd, $J = 8,8$, 2,4 Hz, H-6'). HRMS (ESI) $[M-H]^- (C_{17}H_9F_3N_3O_4)$: calcd. 376,0545 hallado 376,0546.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-cloro-5-fluoro-indirubin-3'-oxima (12a)

RMN de 1H (acetona, 300 MHz, ppm, J en Hz) 13,05 (1H, s, NOH), 11,82 (1H, s, N-H), 9,81 (1H, s, N'-H), 8,67 (1H, s, H-4), 8,35 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-4'), 7,45 (2H, m, H-6, H-7), 7,16 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6'), 6,97 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7'). HRMS (EI) $[M]^+(C_{16}H_9Cl_2N_3O_3)$: calcd. 345,0072 hallado 345,0075.

Datos para (2'Z, 3'E)-1-5'-cloro-5-nitro-indirubin-3'-oxima (12b)

RMN de 1H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm, J en Hz) 11,98 (1H, s, N-H), 11,39 (1H, s, N'-H), 9,45 (1H, s, H-4), 8,25 (1H, s, H-4'), 8,08 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, H-6), 7,50 (2H, m, H-6', H-7), 7,05 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7'). HRMS (ESI) $[M-H]^- (C_{16}H_8ClN_4O_4)$: calcd. 355,0234 hallado 355,0242.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-cloro-5-fluoro-indirubin-3'-oxima (12c)

RMN de 1H (acetona, 300 MHz, ppm, J en Hz) 12,96 (1H, s, NOH), 11,78 (1H, s, N-H), 9,71 (1H, s, N'-H), 8,41 (1H, d, $J = 11,4$ Hz, H-7), 8,32 (1H, s, H-4), 7,40 – 7,50 (2H, m, H-4', H-6'), 6,88 – 6,91 (2H, m, H-6, H-7') HRMS (ESI) $[M-H]^- (C_{16}H_8ClFN_3O_2)$: calcd. 328,0289 hallado 328,0291.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-cloro-5-trifluorometoxi-indirubin-3'-oxima (12d)

RMN de 1H (acetona, 300 MHz, ppm, J en Hz) 13,02 (1H, s, NOH), 11,82 (1H, s, N-H), 9,88 (1H, s, N'-H), 8,63 (1H, s, H-4), 8,34 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-4'), 7,47 (2H, m, H-6, H-7), 7,11 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6'), 7,03 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7'). HRMS (ESI) $[M-H]^- (C_{17}H_8ClF_3N_3O_3)$: calcd. 394,0206 hallado 394,0215.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-fluoro-5-cloro-indirubin-3'-oxima (13a)

RMN de 1H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm, J en Hz) 11,81 (1H, s, N-H), 10,85 (1H, s, N'-H), 8,62 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-4), 7,97 (1H, dd, $J = 8,2$, 2,4 Hz, H-6), 7,47 (1H, m, H-4'), 7,31 (1H, m, H-7), 7,15 (1H, dd, $J = 8,4$, 2 Hz, H-6'), 6,88 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7'). HRMS (ESI) $[M-H]^- (C_{16}H_8ClFN_3O_2)$: calcd. 328,0289 hallado 328,0295.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-fluoro-5-nitro-indirubin-3'-oxima (13b)

RMN de 1H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm, J en Hz) 11,89 (1H, s, N-H), 11,40 (1H, s, N'-H), 9,43 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-4), 8,08 (1H, dd, $J = 8,6$, 2,4 Hz, H-6), 8,00 (1H, dd, $J = 8,6$, 2 Hz, H-7), 7,51 (1H, m, H-4'), 7,33 (1H, td, $J = 9$, 2,8 Hz, H-6'), 7,06 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7'). HRMS (EI) $[M]^+(C_{16}H_9FN_4O_4)$: calcd. 340,0608 hallado 340,0610.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-fluoro-5-fluoro-indirubin-3'-oxima (13c)

RMN de 1H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm, J en Hz) 11,76 (1H, s, N-H), 10,68 (1H, s, N'-H), 8,41 (1H, dd, $J = 11,2$, 2,4 Hz, H-4), 7,93 (1H, dd, $J = 8,8$, 2,4 Hz, H-4'), 7,39 (1H, m, H-7), 7,30 (1H, td, $J = 8,8$, 2 Hz, H-6), 6,93 (1H, td, $J = 9$, 2,4 Hz, H-6'), 6,84 (1H, m, H-7'). HRMS (EI) $[M]^+(C_{16}H_9F_2N_3O_2)$: calcd. 313,0663 hallado 313,0666. Pureza 93%.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-fluoro-5-trifluorometoxi-indirubin-3'-oxima (13d)

RMN de ^1H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm, J en Hz) 12,02 (1H, s, N-H), 10,72 (1H, s, N'-H), 8,59 (1H, s, H-4), 8,02 (1H, dd, $J = 8,8, 2,4$ Hz, H-6), 7,41 (1H, m, H-4'), 7,18 (1H, td, $J = 9,2, 2$ Hz, H-6), 7,00 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7), 6,9 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7'). HRMS (FAB) ($\text{C}_{17}\text{H}_9\text{O}_3\text{N}_3\text{F}_4$): calcd. 379,0579 hallado 379,0580.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-metil-5-cloro-indirubin-3'-oxima (14a)

RMN de ^1H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm, J en Hz) 11,85 (1H, s, N-H), 10,76 (1H, s, N'-H), 8,64 (1H, s, H-4), 8,10 (1H, s, H-4'), 7,29 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6), 7,20 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7), 7,10 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-6'), 6,86 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7'), 2,31 (3H, s, CH_3). HRMS (EI) $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}_2$): calcd. 325,0618 hallado 325,0623.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-metil-5-nitro-indirubin-3'-oxima (14b)

RMN de ^1H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm, J en Hz) 11,87 (1H, s, N-H), 11,38 (1H, s, N'-H), 9,46 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-4), 8,11 (1H, s, H-4'), 8,07 (1H, dd, $J = 8, 2,4$ Hz, H-6), 7,37 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-7), 7,26 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-6'), 7,05 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-7'), 2,32 (3H, s, CH_3). HRMS (ESI) $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_4$): calcd. 335,0780 hallado 335,0787. Pureza 93%.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-metil-5-fluoro-indirubin-3'-oxima (14c)

RMN de ^1H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm, J en Hz) 11,78 (1H, s, N-H), 10,61 (1H, s, N'-H), 8,43 (1H, dd, $J = 11,2, 2,4$ Hz, H-4), 8,06 (1H, s, H-4'), 7,26 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7), 7,17 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-7'), 6,86 (1H, td, $J = 8,4, 2,4$ Hz, H-6), 6,80 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-6'), 2,28 (3H, s, CH_3). HRMS (EI) $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{O}_2$): calcd. 309,0914 hallado 309,0912.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-metil-5-trifluoromeroxi-indirubin-3'-oxima (14d)

RMN de ^1H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm, J en Hz) 11,80 (1H, s, N-H), 10,87 (1H, s, N'-H), 8,59 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-4), 8,09 (1H, s, H-4'), 7,34 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6), 7,25 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-7), 7,10 (1H, d, $J = 7,4$ Hz, H-6'), 6,94 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7'), 2,33 (3H, s, CH_3). HRMS (EI) $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$): calcd. 375,0831 hallado 375,0833.

(Ejemplo 3) Preparación de derivados de indirubin-3'-oxima 5'-metoxi-5-sustituida 16a-c

A una solución de análogos de 5'-hidroxi-indirubina **7d** (10 mg, 0,028 mmol) en acetona (1 ml) se añadió gota a gota yoduro de metilo (17 l, 0,276 mmol) y se añadió K_2CO_3 (19 mg, 0,138 mmol) y la agitación continuó durante 4 horas a temperatura ambiente. El precipitado oscuro se filtró y se lavó con agua fría y se secó a presión reducida para dar derivados de 5'-metoxi-indirubina 5-sustituida, **15c**. El derivado de indirubina adecuado (6 mg, 0,016 mmol) se disolvió en piridina (0,3 ml) y se añadió clorhidrato de hidroxilamina (3,4 mg, 0,048 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo a 120 °C durante 1 hora. Después de enfriar, el producto se acidificó con HCl 1N. La precipitación se filtró y se lavó con agua, para dar cuantitativamente la correspondiente 3'-oxima de forma selectiva en una forma (2'Z, 3'E). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (hexano: acetato de etilo = 2:1).

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-metoxi-5-nitro-indirubin-3'-oxima (16a)

RMN de ^1H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm, J en Hz) 11,82 (1H, s, NOH), 11,78 (1H, s, N-H), 9,46 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-4), 9,33 (1H, s, N'-H), 8,12 (1H, dd, $J = 8,4, 2,4$ Hz, H-6), 7,77 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-4'), 7,30 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7), 7,24 (1H, d, $J = 9,2$ Hz, H-7'), 6,85 (1H, dd, $J = 7,8, 2,4$ Hz, H-6'), 3,39 (3H, s, OCH_3). HRMS (ESI) $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_5$): calcd. 351,0729 hallado 351,0724. Pureza 94%.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-metoxi-5-fluoro-indirubin-3'-oxima (16b).

RMN de ^1H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm, J en Hz) 11,68 (1H, s, N-H), 9,22 (1H, s, N'-H), 8,44 (1H, m, H-4), 7,70 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-4'), 7,21 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-6), 6,96 (2H, m, H-7, H-7'), 6,79 (1H, dd, $J = 8,6, 2,4$ Hz, H-6'), 3,26 (3H, s, OCH_3). HRMS (EI) $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{O}_3$): calcd. 325,0863 hallado 325,0859.

Datos para (2'Z, 3'E)-5'-metoxi-5-trifluoromeroxi-indirubin-3'-oxima (16c)

RMN de ^1H NMR (acetona, 400 MHz, ppm, J en Hz) 11,70 (1H, s, N-H), 8,62 (1H, s, H-4), 8,28 (1H, s, N'-H), 7,90 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-4'), 7,24 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6), 7,12 (1H, m, H-7'), 7,04 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7), 6,99 (1H, dd, $J = 8,4, 2,4$ Hz, H-6'), 3,33 (3H, s, OCH_3). HRMS (EI) $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4$): calcd. 391,0780 hallado 391,0782.

(Ejemplo 4) Anclaje molecular

El anclaje molecular se realizó usando CDocker, un algoritmo de anclaje de dinámica molecular basada en CHARMM en Discovery Studio 2,0 (Accelrys). La estructura de CDK2 cocristalizó con 5-bromo-indirubina se obtuvo del banco de datos de PDB (código de PDB: 2BHE). Secuencialmente se aplicó un proceso limpio de proteínas y un campo de fuerza CHARMM. El área alrededor de 5-bromo-indirubina se eligió como el sitio activo, con el radio fijado en 8 Å. Después de eliminar el ligando de la estructura del complejo se construyó una esfera de unión en las tres direcciones del eje alrededor del sitio activo. En el proceso de anclaje se usaron todos los parámetros por defecto. Se usaron dinámicas moleculares basadas en CHARMM (1.000 etapas) para generar conformaciones aleatorias del ligando **11b** y la posición de cualquier ligando **11b** se optimizó en el sitio de unión usando rotación del cuerpo rígido, seguido de hibridación similar a 700 K. La minimización de energía final se fijó como el modo de potencial completo. La conformación de unión final de **11** se determine en base a la energía. El estudio de anclaje del ligando **2**, **13b** se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.

(Ejemplo 5) Métodos biológicos

Ensayo enzimático

CDK1/ciclina B, CDK2/ciclina E se adquirieron en Millipore (Billerica, MA). La actividad cinasa se analizó en el tampón (MOPS 8 mM a pH 7,0, EDTA 0,2 mM, acetato de Mg 10 mM), con 0,1 mg/ml de la histona H1, en presencia de [³³P] ATP 45 M (500 cpm/pmol) para CDK1 o [³³P] ATP 120 μM (500 cpm/pmol) para CDK2 en un volumen de reacción final de 25 μM. La reacción se inició mediante la adición de la mezcla de MgATP. Tras incubación durante 40 minutos a 30 °C, la reacción se detuvo mediante la adición de 5 μl de solución de ácido fosfórico al 3 %. Se pasaron alícuotas de 10 μl del sobrenadante sobre piezas de 2,5 cm x 3 cm de papel de fosfo celulosa Whatman P30 y 20 segundos después, se lavaron los filtros tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secar. Los filtros mojados se contaron en presencia de 1 ml de líquido de centelleo ACS (Amersham). Las actividades normalmente se expresan como un porcentaje de la actividad máxima, es decir en ausencia de inhibidores. Los controles se aplicaron con las diluciones adecuadas en DMSO.

La inhibición de la actividad cinasa contra una diversidad de cinasas recombinantes (c-Met, Met M1250T, Ron, VEGF2, EGFR, TrkA, PI3Kγ, receptor de la insulina IKKβ, Aurora A) se midió usando ensayos de fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea (HTRF). En resumen, los ensayos se basan en la fosforilación de sustratos peptídicos en presencia de ATP. Los sustratos fosforilados resultantes se detectan mediante señal TR-FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia-resuelta en el tiempo). Las proteínas recombinantes que contienen el dominio cinasa se adquirieron de Millipore (Billerica, MA). Las concentraciones óptimas de la enzima, el ATP y el sustrato se establecieron para cada enzima usando el kit HTRF KinEASE (Cisbio) de acuerdo con la instrucción del fabricante. Los ensayos están compuestos por enzimas mezcladas con compuestos diluidos en serie y sustratos peptídicos en tampón de reacción de cinasa (HEPES 250 mM (pH 7,0), ortovanadato 0,5 mM, BSA al 0,05 %, NaN₃ al 0,1 %). Tras la adición de los reactivos para detección se midió la señal TR-FRET usando el lector multimarcador EnVision (Perkin Elmer, Waltham, MA).

Ensayo de proliferación celular

Las células (A549, HT1080, HCT116, K562, SNU638, KB, MCF-7) se contaron, se diluyeron a 5×10^4 células/ml con medio recién preparado (MEME, DMEM o RPMI que contiene 10 % de FBS) y se añadieron 190 μl de suspensión celular a placas de 96 pocillos que contienen varias concentraciones de los compuestos de ensayo (10 μl en 10 % de DMSO acuoso). Las placas de ensayo se incubaron durante 3 días a 37 °C en incubador de CO₂. Para los controles del día cero, las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en incubador de CO₂. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Tras los periodos de incubación, las células se fijaron con 50 μl de TCA al 50 % frío a 4 °C durante 30 minutos, se lavaron 5 veces con agua corriente y se secaron al aire. Las células fijas se tiñeron con una solución de SRB al 0,4 % en ácido acético acuoso al 1 % a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la solución de SRB libre se eliminó lavando 5 veces con ácido acético al 1 % y se secó. El pigmento unido se disolvió con 200 l de Tris-base 10 mM (pH 10,0) y la absorbancia se determinó a 515 nm usando un lector de microplacas de ELISA. Por último, los valores de absorbancias obtenidos con cada uno de los procedimientos de tratamiento se promediaron y se restaron los valores promedio obtenidos con el control del día cero. Estos resultados se expresaron como un porcentaje con respecto a las incubaciones control tratadas con el disolvente y los valores de Cl₅₀ se calcularon usando análisis de regresión no lineal (porcentaje de supervivencia frente a la concentración).

Modelo animal de xenoinjerto tumoral

La línea de células epiteliales renales de rata transformada con k-ras (RK3E-ras) se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10 % de FCS, 100 unidades/ml de penicilina y 100 Ag/ml de estreptomycin. Las células RK3E-ras las proporcionó amablemente el Dr. Eric Fearon (University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI) y se han descrito en el informe anterior. Se usaron ratas SD macho (6 semanas de edad) para examinar la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*. Por vía subcutánea se implantaron células RK3E-ras-Luc (5×10^6) en el flanco de las ratas el día 0 y las ratas se agruparon aleatoriamente (5 ratones/grupo) el día 5 como se ha descrito anteriormente. Una solución de **11b** en una mezcla de PEG400, EtOH y DW (30:33:37, 3 mg/ml, 5 mg/kg) se administró por vía

intravenosa sin anestesia en días alternos un total de cinco veces. Se sacrificó a los animales 48 horas después de la última administración y se midieron los pesos de las ratas y los volúmenes tumorales. Los volúmenes de crecimiento tumoral se calcularon del siguiente modo: $V = (ab^2) / 2$, donde a es el diámetro más largo y b es el diámetro más corto del tumor. Todos los experimentos se realizaron conforme a los protocolos aprobados por el

5 Comité de Cuidados y Uso de animales en la Chosun University School of Dentistry (Gwangju, Corea del Sur).

Ensayo de imagen por bioluminiscencia

10 Para la obtención de imágenes por bioluminiscencia, las ratas recibieron una inyección i.p. de luciferina (Molecular Probes, Palo Alto, CA) con anestesia de Rumpun/ketamina (1:1). Se obtuvieron imágenes de las ratas usando el sistema de imagen LAS-1000 plus (Fuji film. Tokio. Japón) para registrar la señal de bioluminiscencia emitida del tumor. El sistema LAS-1000 equipado con una cámara CCD se usó para la adquisición de la luz emitida y se usó el software Living Image (Multi Gauge v3,0) para el análisis de datos.

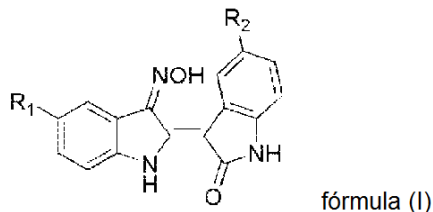
15 Histología, inmunohistoquímica y ensayo TUNEL

Los tumores sólidos extirpados se fijaron en formalina tamponada al 10 % y se incluyeron en parafina. Para los exámenes por microscopia óptica se tiñeron tejidos seccionados de 4 μ m con H y E. La tinción inmunohistoquímica se realizó con el método del complejo de avidina-biotina usando anticuerpos anti-PCNA. Las reacciones inmunitarias se visualizaron con 3,3'-diaminobencidina y se contratiñeron con hematoxilina de Mayer. Se realizó un ensayo TUNEL usando un kit de detección de apoptosis ApopTag PlusPeroxidase *in situ* (Intergen, Purchase, NY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, los portaobjetos se desparafinizaron y se trataron con 20 μ g/ml de proteinasa K a 37 °C durante 15 minutos para potenciar la tinción. Tras inmersión en 3 % de peróxido de hidrógeno para bloquear la peroxidasa endógena, los portaobjetos se incubaron con un tampón de reacción que contiene desoxinucleotidiltransferasa terminal a 37 °C durante 1 hora. Después, los portaobjetos se incubaron con un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con peroxidasa durante 30 minutos y los productos de reacción se visualizaron con una solución de 3,3'-diaminobencidina al 0,03 % que contiene peróxido de hidrógeno 2 mM. Los portaobjetos se sometieron a contratinción con 0,5 % de verde de metilo.

30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto derivado de indirubin-3'-oxima como inhibidor de cinasas dependientes de ciclina con actividad anticancerosa representado por la fórmula (I)



en la que

R₁ se selecciona de F, Cl, OH o CH₃
R₂ se selecciona de F, Cl o NO₂

2. El compuesto derivado de indirubin-3'-oxima de acuerdo con la reivindicación 1, en el que comprende que R₁ es OH y R₂ es NO₂;

3. El compuesto derivado de indirubin-3'-oxima de acuerdo con la reivindicación 1, en el que comprende que R₁ es F y R₂ es NO₂.

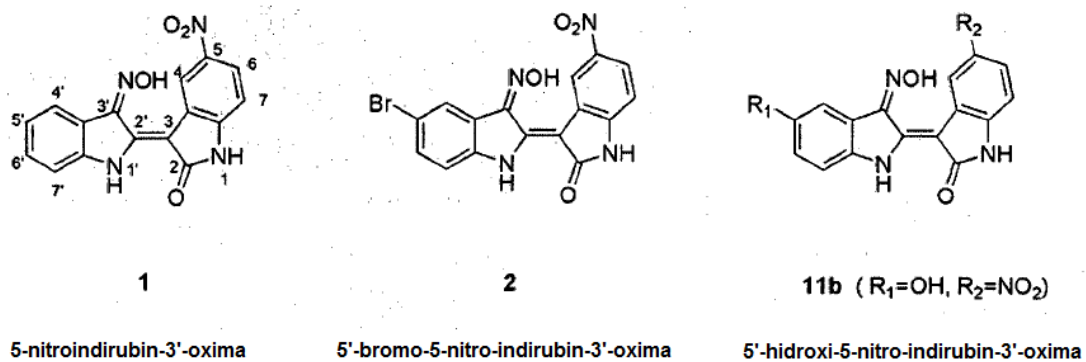
4. El compuesto derivado de indirubin-3'-oxima de acuerdo con la reivindicación 1,

en el que i) un compuesto comprende que R₁ es OH y R₂ es Cl, ii) un compuesto comprende que R₁ es OH y R₂ es F, iii) un compuesto comprende que R₁ es Cl y R₂ es NO₂, y iv) un compuesto comprende que R₁ es CH₃ y R₂ es NO₂.

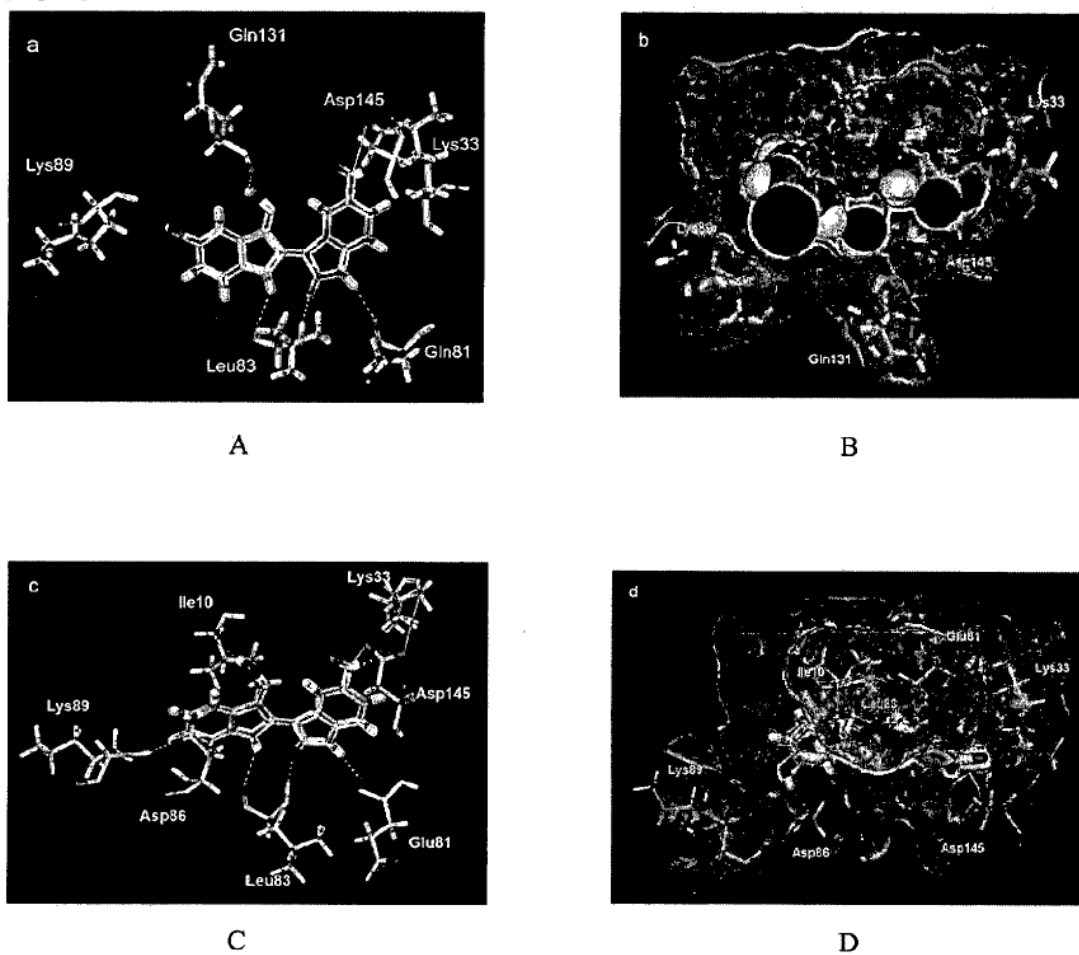
5. El compuesto derivado de indirubin-3'-oxima de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto derivado de indirubin-3'-oxima tiene actividad anticancerosa contra la línea celular de cáncer de pulmón humano, la línea celular de fibrosarcoma humano, la línea celular de cáncer de colon humano, la línea celular de leucemia humana, la línea celular de cáncer de estómago humano, la línea celular de cáncer nasofaríngeo humano y/o la línea celular de cáncer de mama humano.

6. Una composición anticancerosa que comprende dicho compuesto derivado de indirubin-3'-oxima y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

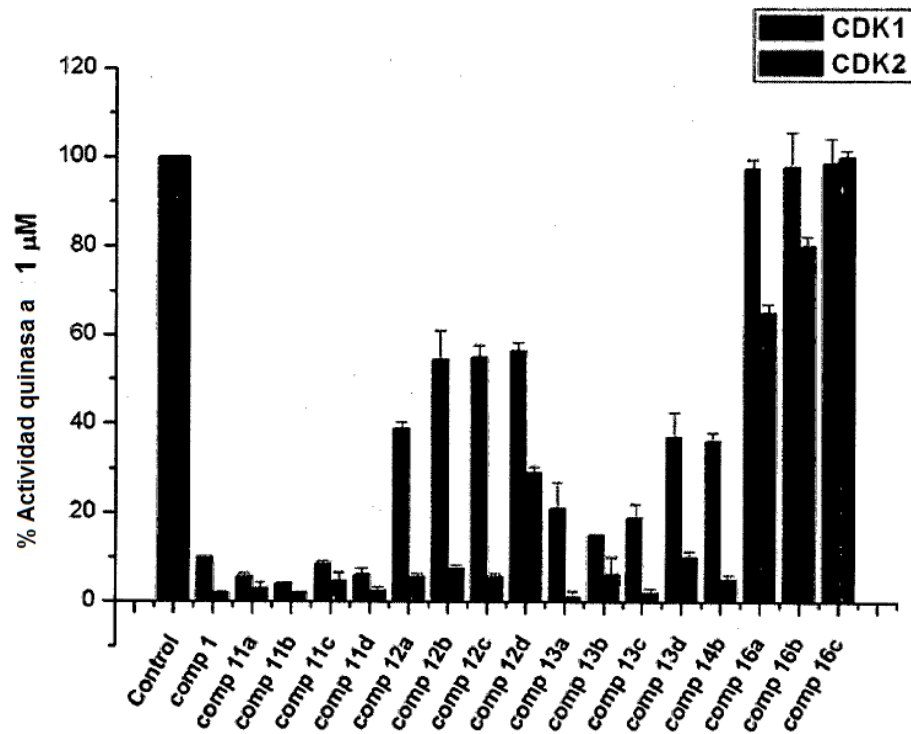
[Fig. 1]



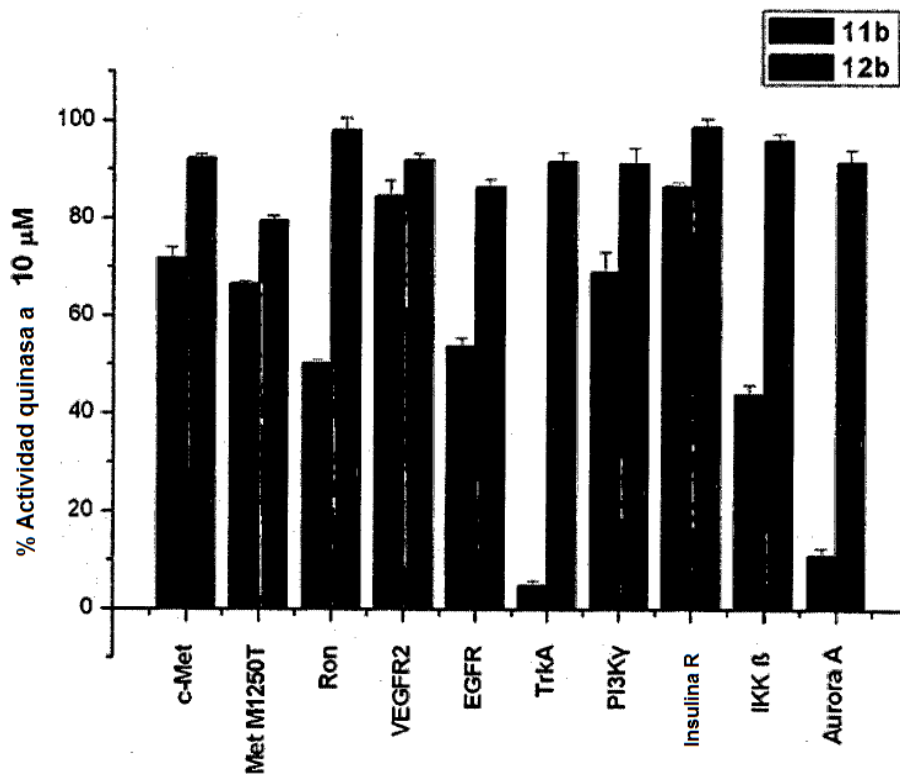
[Fig. 2]



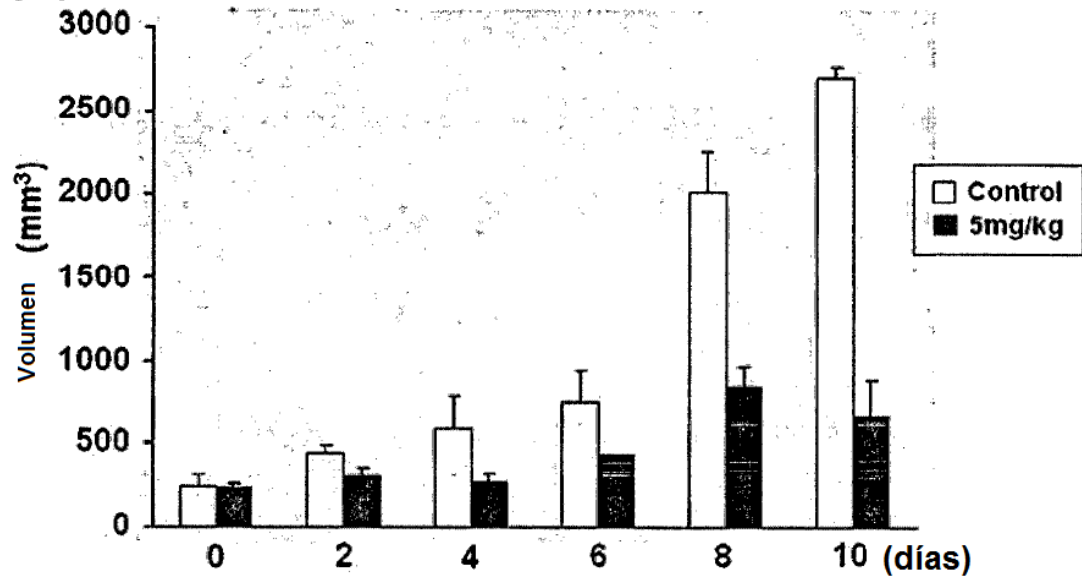
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



A

Tumor

Imagen

Control

Control

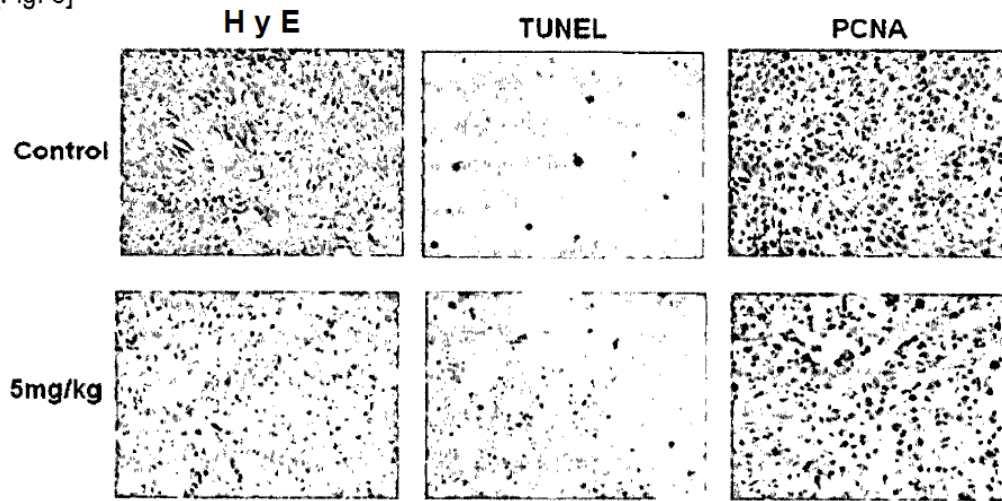
5mg/kg

5mg/kg

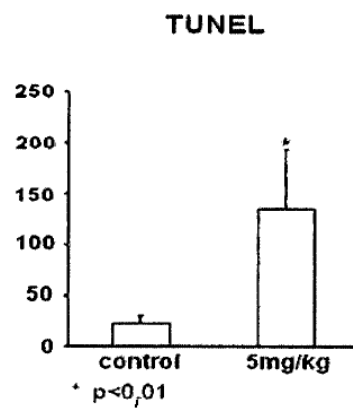
B

C

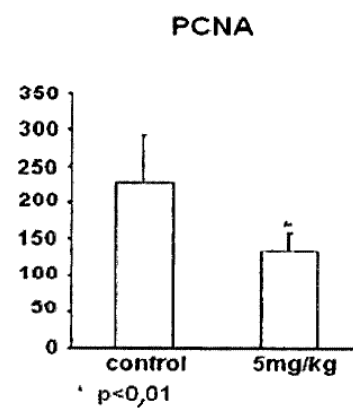
[Fig. 6]



A



B



C