

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 197**

51 Int. Cl.:

C07D 217/24	(2006.01) A61K 31/47	(2006.01)
C07D 223/16	(2006.01) A61K 31/495	(2006.01)
C07D 239/91	(2006.01) A61K 31/5513	(2006.01)
C07D 243/14	(2006.01) A61K 31/517	(2006.01)
C07D 245/04	(2006.01) A61K 49/00	(2006.01)
C07D 245/06	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
C07D 405/04	(2006.01)	
C07D 409/04	(2006.01)	
C07D 471/04	(2006.01)	
C07D 487/04	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2005 PCT/US2005/019244**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2005 WO05117876**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2005 E 05756099 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 1750706**

54 Título: **Inhibidores dobles de molécula pequeña de cáncer y angiogénesis**

30 Prioridad:

01.06.2004 US 575927 P

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

03.03.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION
(100.0%)
250 WEST MAIN STREET, SUITE 300
CHARLOTTESVILLE, VA 22902, US**

72 Inventor/es:

BROWN, MILTON, L.

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 604 197 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).

INHIBIDORES DOBLES DE MOLÉCULA PEQUEÑA DE CÁNCER Y ANGIOGENESIS**DESCRIPCIÓN****5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud, en virtud de 35 U.S.C. § 119(e) tiene derecho a prioridad sobre la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/575.927, presentada el 1 de junio de 2004.

10 Antecedentes

El cáncer colorrectal es la segunda causa más común de mortalidad relacionada con cáncer en Europa y América del Norte. Este cáncer afecta a casi 150.000 pacientes y da como resultado más de 60.000 muertes en los Estados Unidos al año. Pese a los avances significativos en el tratamiento de pacientes con cáncer de colon, ha habido poco cambio en las tasas de supervivencia a lo largo de los últimos 50 años. La principal causa de muerte se refiere al desarrollo de metástasis distantes de órganos tales como el hígado y los pulmones. Desgraciadamente, el cáncer de colon todavía sigue siendo uno de los tipos más comunes de tumores malignos epiteliales en ambos sexos y es esencialmente incurable cuando alcanza los estadios más avanzados.

La extirpación quirúrgica sigue siendo el tratamiento de referencia actual para pacientes con cáncer colorrectal localizado. También han surgido varias estrategias de quimioterapia adyuvante y ahora se ha establecido el uso de 5-fluorouracilo (5-FU) con rescate de leucovorina (LV) en el cáncer de colon en estadio III. Considerando las altas tasas de recurrencia del cáncer de colon y los efectos secundarios de las terapias quirúrgicas y químicas, el descubrimiento de compuestos novedosos que bloqueen, inviertan, retrasen o impidan el desarrollo de neoplasias invasivas de intestino grueso sería de la mayor importancia.

El adenocarcinoma representa el 90-95% de todos los cánceres colorrectales y la mayoría de las líneas celulares cultivadas humanas reflejan este fenotipo. La tabla 1 resume las diferencias en algunas líneas celulares de colon humanas disponibles en relación con la edad, sexo, histología/grado y fuente (es decir, ascitis frente a tumor primario). Estas líneas celulares cultivadas proporcionan una gran oportunidad para evaluar compuestos novedosos para determinar su eficacia y para establecer su mecanismo de acción.

Tabla 1. Líneas celulares de cáncer de colon humanas cultivadas del NCI.

Línea celular ^a	Sexo	Edad del paciente	Histología	Tratamiento	Fuente
COLO 205 HCC-2998 HCT-15	M	70	Adenocarcinoma Carcinoma Adenocarcinoma Adenocarcinoma/ grado III	S N	Ascitis
HCT-116 HT29 KM12	F	44	Adenocarcinoma Adenocarcinoma		Primaria
SW-60	M	51	Adenocarcinoma	N	Metástasis

^aLíneas celulares disponibles del Instituto Nacional del Cáncer (NCI).

La tubulina, la subunidad proteica de los microtúbulos celulares, es la diana de varios agentes quimioterápicos eficaces contra el cáncer en uso clínico actualmente. La tubulina está compuesta por un heterodímero α/β , y se conocen al menos seis isotipos de α -tubulina humana y siete de β -tubulina humana (productos génicos). En general, se cree que el repertorio de isotipos de β -tubulina desempeña un papel significativo en el desarrollo y la construcción de estructuras celulares especializadas basadas en microtúbulos, y la alteración general de microtúbulos celulares es un objetivo para la quimioterapia contra el cáncer que ha demostrado ser eficaz.

En muchos organismos, ambos isotipos de tubulina α y β difieren en sus distribuciones tisulares. En mamíferos, los isotipos β_I y β_{IV} están bastante extendidos, y β_{II} es menor, mientras que β_{III} y β_{VI} tienen distribuciones limitadas y se desconoce la distribución de β_V . Como herramienta para localizar los isotipos, se ha notificado la preparación de anticuerpos monoclonales específicos para los isotipos β_I , β_{III} , β_{IV} y β_V (Banerjee *et al.*, J. Biol. Chem. 1988, 263:3029-3034). Los isotipos β se han localizado en varios tejidos humanos incluyendo oviducto, piel, colon y páncreas con diferencias sorprendentes en sus distribuciones tisulares. De hecho, hay poco o ningún β_{III} en estos tejidos, excepto por las células epiteliales columnares del colon (Roach *et al.*, Cell Motility and the Cytoskeleton 1998, 39:4:273-285).

La arquitectura, el crecimiento, la división y el transporte intracelular de las células normales dependen de los

microtúbulos. Los microtúbulos son estructuras versátiles y altamente dinámicas que experimentan cambios rápidos en respuesta a señalización celular de una variedad de estímulos. La inestabilidad dinámica de los microtúbulos es crítica para sus funciones normales. Los fármacos que afectan a la respuesta dinámica de los microtúbulos pueden conducir a función alterada de los microtúbulos, metabolismo celular anómalo, y pueden conducir en última instancia a apoptosis.

En líneas celulares resistentes a fármacos de estabilización de microtúbulos que expresan mutaciones heterocigotas de tubulina, es importante la cantidad relativa de expresión de tubulina mutante. En estas líneas celulares se ha demostrado la ausencia de tubulina beta II y beta IVa y se ha confirmado un nivel aumentado de expresión de tubulina beta III en células resistentes (Verdier- Pinard *et al.*, Biochemistry, 42(18):5349-57, 2003), lo que indica que este isotipo de tubulina puede desempeñar un papel significativo en la resistencia a taxol. Por consiguiente, la presente invención se refiere a inhibidores selectivos de tubulina y al uso de tales inhibidores para regular selectivamente la expresión y la localización de isotipos de β -tubulina en tejidos como medio de tratamiento de cánceres que anteriormente eran difíciles de tratar usando agentes quimioterápicos.

Los agentes antimicrotubulares comprenden algunos de los agentes quimioterápicos contra el cáncer más ampliamente usados y eficaces en uso clínico (Rowinsky, E. K. y Tolcher, A. W. Antimicrotubule Agents. En: V. T. J. DeVita, S. Hellman, y S. A. Rosenberg (eds.), Cancer Principles and Practice of Oncology, 6ª edición, Vol. 1, págs. 431-447. Filadelfia, PA: Lippincott, Williams y Wilkins, 2001). Animados por el éxito clínico de los alcaloides de la vinca y los taxanos, se han centrado esfuerzos significativos en identificar nuevos agentes que tienen un mecanismo similar de acción, pero propiedades superiores incluyendo la capacidad para eludir los mecanismos de resistencia a fármacos, mostrar mejor solubilidad y disponibilidad oral.

Un problema grave asociado con el tratamiento del cáncer es el desarrollo de resistencia a fármacos. Algunos tumores son intrínsecamente resistentes a quimioterapia y otros desarrollan resistencia a fármacos durante la quimioterapia. Una proporción significativa de tumores son resistentes a múltiples fármacos debido a la sobreexpresión de proteínas de membrana que actúan como bombas de eflujo de fármacos. La sobreexpresión del producto génico de MDR-1, la P-glicoproteína (Pgp), conduce a una acumulación de fármaco intracelular disminuida y a efectos citotóxicos atenuados. Clínicamente, la resistencia a múltiples fármacos conferida por la expresión de Pgp puede limitar la utilidad de muchos agentes disponibles en la actualidad incluyendo vinblastina, vincristina, taxol y docetaxol. Hay una clara necesidad de nuevos fármacos que pueden eludir la resistencia a múltiples fármacos.

Un segundo motivo principal para el desarrollo de nuevos agentes activos para microtúbulos es que los agentes de alteración de microtúbulos son en algunos casos eficaces contra tumores que expresan p53 anómala. El gen supresor tumoral que codifica para p53 es el gen mutado más frecuentemente en cánceres humanos. Se estima que la mitad de todos los cánceres en los Estados Unidos muestran p53 alterada (Hollstein *et al.* Science, 253: 49-53, 1991).

Además, se ha encontrado recientemente que compuestos que tienen como objetivo los microtúbulos celulares muestran actividades antiangiogénicas y esto puede contribuir a sus eficacias antitumorales y anticancerosas (Miller, *et al.*, J. Clin. Oncol. 19, 1195-1206, 2001). Los taxanos, taxol y docetaxel, vinblastina, vincristina, combretastatina (Holwell *et al.*, Anticancer Research 22(6C):3933-40, 2002) y el 2-metoxiestradiol tienen todos ellos actividad antiangiogénica *in vivo* (Miller, *et al.*, J. Clin. Oncol., 19:1195-1206, 2001).

La angiogénesis es el proceso por el que se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes. Este proceso es complejo y comienza con la degradación de la membrana basal por proteasas secretadas por células endoteliales activadas. La migración y la proliferación conduce a la formación de brotes sólidos de células endoteliales en el espacio estromal. Se desarrollan bucles vasculares y tubos capilares con formación de uniones estrechas y deposición de nueva membrana basal. Este proceso es importante en la reproducción normal, el desarrollo embrionario y la curación de heridas. Sin embargo, la angiogénesis regulada de manera inadecuada se ha implicado en muchas enfermedades incluyendo cáncer.

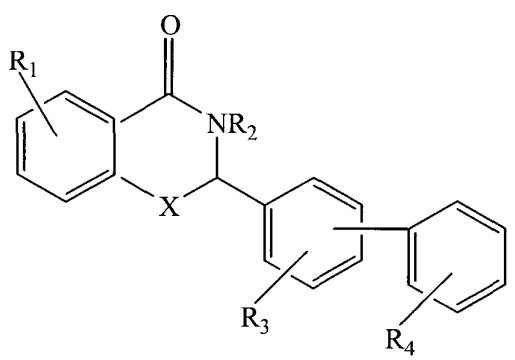
El crecimiento tumoral requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos (es decir, angiogénesis). Se cree que las células tumorales inician y mantienen la angiogénesis expresando una red de factores angiogénicos, incluyendo factores de crecimiento endotelial tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), citocinas angiogénicas tales como interleucina-8 (IL-8), metaloproteinasas de la matriz (MMP) tales como MMP-2 y MMP-9, y moléculas de adhesión tales como integrinas y cadherinas. Considerando la relevancia de la angiogénesis en la progresión tumoral, han surgido terapias antiangiogénicas como modalidad potencialmente prometedora de terapia contra el cáncer. Se ha desarrollado una variedad de estrategias anti-angiogénicas, incluyendo: 1) inhibidores endógenos de la angiogénesis (por ejemplo, endostatina); 2) bloqueantes de la supervivencia endotelial y factores/receptores de crecimiento (por ejemplo, anticuerpo frente a VEGF e inhibidor de la tirosina cinasa receptora de VEGF, SU6668); y 3) inhibidores de moléculas de adhesión o MMP (por ejemplo, anticuerpos contra integrina). Desgraciadamente, el uso de agentes antiangiogénicos para tratar cáncer ha demostrado ser difícil y las estrategias puramente antiangiogénicas han fracasado en clínica. Aunque estos agentes inhiben la angiogénesis tumoral en estudios con animales, la supresión completa de la angiogénesis o la reducción de tumores en pacientes ha sido poco frecuente.

Existe una necesidad desde hace mucho tiempo en la técnica de un método mejor para identificar y preparar compuestos que puedan regular células cancerosas, angiogénesis, células endoteliales y formación de tumores. La presente invención satisface estas necesidades.

Hamel *et al.*, Biochemical Pharmacology, vol. 51, págs. 53-39, 1996, dan a conocer derivados de 2,3-dihidro-2-(aril)-4(1*H*)-quinazolinona con actividad antitumoral.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una serie de compuestos que tienen actividad antimicrotubulina y/o antiangiogénica. Tales compuestos, y composiciones que comprenden estos compuestos, pueden usarse para tratar enfermedades neoplásicas y otros trastornos, enfermedades y estados proliferativos asociados con el crecimiento excesivo o no controlado de las células, tales como tumores. La invención engloba inhibir o impedir el riego sanguíneo a los tejidos o las células tales como el cáncer, incluyendo inhibir células endoteliales vasculares. Estos compuestos tienen la estructura general de fórmula I:



en la que R₁, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, halo y alquilo C₁-C₄;

X es NR₅; y

R₂ y R₅ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, halo, arilo C₅-C₆, alquilo C₁-C₄, alquenilo C₁-C₄ y alquinilo C₁-C₄.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa los efectos de SC-2-71 contra las 60 líneas celulares humanas del NCI (GI₅₀).

La figura 2 representa los efectos de despolimerización de microtúbulos de SC-2-71 en células A-10.

La figura 3 demuestra husos mitóticos anómalos iniciados por concentraciones micromolares bajas de SC-2-71 en células HeLa.

La figura 4 representa estudios citométricos de flujo de MDA-MB-435 tratadas con SC-2-71 3 μM.

La figura 5 demuestra una alineación de secuencias de βIII-tubulina con la estructura por rayos X conocida.

La figura 6 demuestra el acoplamiento de SC-2-71 en el modelo de homología de βIII.

La figura 7 demuestra el acoplamiento flexible de la etiqueta de fotoafinidad potencial SC-4-283.

Descripción detallada de la invención

Abreviaturas

5FU- 5-fluorouracilo

CAM- membrana corioalantoidea de pollo

CoMFA- análisis de campo molecular comparativo

HMEC- célula endotelial de microvaso humana

HUVEC- célula endotelial de vena umbilical humana

IL- interleucina

LV- leucovorina

MDR- resistente a múltiples fármacos

MMP- metaloproteinasas de la matriz

MVD- densidad de microvasos

Pgp- P-glicoproteína

Rr- resistencia relativa

VEGF- factor de crecimiento endotelial vascular

Definiciones

En la descripción y las reivindicaciones de la invención, se usará la siguiente terminología según las definiciones expuestas a continuación.

Tal como se usa en el presente documento, los artículos “un” y “una” se refieren a uno o a más de uno, es decir, a al menos uno, del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

Una enfermedad o trastorno se “alivia” si se reduce la gravedad de un síntoma de la enfermedad, estado o trastorno, o la frecuencia con la que un sujeto experimenta tal síntoma, o ambos.

Tal como se usa en el presente documento, un “análogo” de un compuesto químico es un compuesto que, a modo de ejemplo, se parece a otro en estructura pero no es necesariamente un isómero (por ejemplo, 5-fluorouracilo es un análogo de timina).

Enfermedad o trastorno “asociado con angiogénesis” trastorno se refiere a una enfermedad o trastorno asociado con angiogénesis aberrante o a una enfermedad o trastorno dependiente de angiogénesis. Los cambios en la densidad de microvasos están englobados dentro del término “asociado con angiogénesis”.

“Antiproliferativo,” tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un compuesto para impedir o inhibir la proliferación celular. Como tal, el compuesto puede actuar directamente sobre una célula o puede actuar indirectamente. Por ejemplo, en el contexto del cáncer, puede inhibirse la proliferación de una célula cancerosa privándola del riego sanguíneo. El término “antiproliferativo” no se refiere a un mecanismo particular por el que se inhibe o impide la proliferación.

El término “cáncer,” tal como se usa en el presente documento, se define como proliferación de células cuyo rasgo único (pérdida de los controles normal) da como resultado nuevas características tales como crecimiento no regulado, falta de diferenciación, invasión tisular local y metástasis. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, melanoma, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer renal, leucemia, carcinoma de células no pequeñas y cáncer de pulmón.

Tal como se usa en el presente documento, un “derivado” de un compuesto se refiere a un compuesto químico que puede producirse a partir de otro compuesto de estructura similar en una o más etapas, como en la sustitución de H por un grupo alquilo, acilo o amino.

El término “alterar” tal como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad de un compuesto de la invención para inhibir la polimerización de microtúbulos o la capacidad de un compuesto de la invención para inducir al menos la despolimerización parcial de microtúbulos.

“Homólogo” tal como se usa en el presente documento, se refiere a la similitud de secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptido. Cuando una posición de subunidad en ambas de las dos moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica, por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas, por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias de

compuesto son homólogas, entonces las dos secuencias son homólogas en el 50%, si el 90% de las posiciones, por ejemplo, 9 de 10, son coincidentes u homólogas, las dos secuencias comparten una homología del 90%. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 3'ATTGCCS' y 3'TATGGC comparten una homología del 50%.

5 Tal como se usa en el presente documento, "homología" se usa de manera sinónima con "identidad".

La determinación de la identidad en porcentaje entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos puede llevarse a cabo usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, un algoritmo matemático útil para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268), modificado como en Karlin y Altschul (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877). Este algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, *et al.* (1990, J. Mol. Biol. 215:403-410), y puede accederse a él, por ejemplo en el sitio www del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos en BLAST con el programa NBLAST (designado "blastn" en el sitio web del NCBI), usando los siguientes parámetros: penalización de hueco = 5; penalización por extensión de hueco = 2; penalización por falta de coincidencia = 3; recompensa por coincidencia = 1; valor esperado 10,0; y tamaño de palabra = 11 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico descrito en el presente documento. Pueden realizarse búsquedas de proteínas en BLAST con el programa XBLAST (designado "blastn" en el sitio web del NCBI) o en el programa "blastp" del NCBI, usando los siguientes parámetros: valor esperado 10,0, matriz de puntuación BLOSUM62 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína descrita en el presente documento. Para obtener alineaciones con huecos para fines de comparación, puede utilizarse BLAST con huecos tal como se describe en Altschul *et al.* (1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). Alternativamente, puede usarse PSI-Blast o PHI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta la relación distante entre moléculas (Id.) y la relación entre moléculas que comparten un patrón común. Cuando se utilizan los programas BLAST, BLAST con huecos, PSI-Blast y PHI-Blast, pueden usarse los parámetros por defectos de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

La identidad en porcentaje entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin permitir huecos. En el cálculo de la identidad en porcentaje, normalmente se cuentan coincidencias exactas.

El término "inhibir," tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un compuesto de la invención para reducir o impedir una función descrita, tal como proliferación celular, crecimiento tumoral o angiogénesis. Preferiblemente, la inhibición es en al menos el 10%, más preferiblemente en al menos el 25%, incluso más preferiblemente en al menos el 50%, y lo más preferiblemente, la función se inhibe en al menos el 75%.

Tal como se usa en el presente documento, un "material de instrucciones" incluye una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que puede usarse para comunicar la utilidad del péptido de la invención en el kit para lograr el alivio de diversas enfermedades o trastornos citados en el presente documento. Opcional o alternativamente, el material de instrucciones puede describir uno o más métodos de alivio de las enfermedades o trastornos en una célula o un tejido de un mamífero. El material de instrucciones del kit de la invención puede fijarse, por ejemplo, a un recipiente que contiene el compuesto identificado de la invención o puede enviarse junto con un recipiente que contiene el compuesto identificado. Alternativamente, el material de instrucciones puede enviarse por separado del recipiente con la intención de que el material de instrucciones y el compuesto se usen cooperativamente por el receptor.

Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un segmento o fragmento de ácido nucleico que se ha separado de las secuencias que lo flanquean en un estado que se produce de manera natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha retirado de las secuencias que normalmente son adyacentes al fragmento, por ejemplo, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en el que se produce de manera natural. El término también se aplica a ácidos nucleicos que se han purificado sustancialmente a partir de otros componentes que acompañan de manera natural al ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN o proteínas, que lo acompañan de manera natural en la célula. El término por tanto incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido que se replica de manera autónoma o en un virus, o en el ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe como molécula separada (por ejemplo, como ADNc o fragmento de ADNc o genómico producido por PCR o digestión con enzimas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica para una secuencia de polipéptido adicional.

A menos que se especifique de otro modo, una "secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican para la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas y ARN pueden incluir intrones.

Tal como se usa en el presente documento, un "material de instrucciones" incluye una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que puede usarse para comunicar la utilidad de la composición de la invención para su uso designado. El material de instrucciones del kit de la invención puede fijarse, por ejemplo, a un recipiente que contiene la composición o puede enviarse junto con un recipiente que contiene la composición.

Alternativamente, el material de instrucciones puede enviarse por separado del recipiente con la intención de que el material de instrucciones y la composición se usen cooperativamente por el receptor.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “purificado” y términos similares se refieren a un enriquecimiento de una molécula o compuesto en relación con otros compuestos asociados normalmente con la molécula o compuesto en un entorno nativo. El término “purificado” no indica necesariamente que se ha logrado la pureza completa de la molécula particular durante el procedimiento. Un compuesto “altamente purificado” tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que es puro en más del 90%.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera de los portadores farmacéuticos convencionales, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua o de agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes. El término también engloba cualquiera de los agentes aprobados por una agencia normativa del gobierno federal de los EE.UU. o enumerado en la farmacopea de los EE.UU. para su uso en animales, incluyendo seres humanos.

15 Un “sujeto” de diagnóstico o tratamiento es un mamífero, incluyendo un ser humano.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “tratar” incluye la profilaxis del trastorno o el estado específico, o el alivio de los síntomas asociados con un trastorno o estado específico y/o la prevención o eliminación de dichos síntomas. Un tratamiento “profiláctico” es un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad o que sólo muestra signos tempranos de la enfermedad para el fin de disminuir el riesgo de desarrollar patología asociada con la enfermedad.

25 Un tratamiento “terapéutico” es un tratamiento administrado a un sujeto que muestra signos de patología para el fin de disminuir o eliminar estos signos.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto es aquella cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al que se administra el compuesto.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “tratar” incluye profilaxis de la enfermedad, trastorno o estado específico, o alivio de los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o estado específico y/o prevención o eliminación de dichos síntomas.

35 Tal como se usa en el presente documento, una “cantidad eficaz” significa una cantidad suficiente para producir un efecto seleccionado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un agente antimicrotubular es una cantidad que altera la respuesta dinámica de las microtubulinas.

Definiciones químicas

40 Tal como se usa en el presente documento, el término “halógeno” o “halo” incluye bromo, cloro, flúor y yodo.

El término “haloalquilo” tal como se usa en el presente documento se refiere a un radical alquilo que porta al menos un sustituyente de halógeno, por ejemplo, clorometilo, fluoroetilo o trifluorometilo y similares.

45 El término “alquilo C_1-C_n ” en el que n es un número entero, tal como se usa en el presente documento, representa un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene desde uno hasta el número especificado de átomos de carbono. Normalmente, los grupos alquilo C_1-C_6 incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, y similares.

50 El término “alqueno C_2-C_n ” en el que n es un número entero, tal como se usa en el presente documento, representa un grupo lineal o ramificado olefinicamente insaturado que tiene desde 2 hasta el número especificado de átomos de carbono y al menos un doble enlace. Los ejemplos de tales grupos incluyen, pero no se limitan a, 1-propenilo, 2-propenilo, 1,3-butadienilo, 1-butenilo, hexenilo, pentenilo, y similares.

55 El término “alquino C_2-C_n ” en el que n es un número entero se refiere a un grupo lineal o ramificado insaturado que tiene desde 2 hasta el número especificado de átomos de carbono y al menos un triple enlace. Los ejemplos de tales grupos incluyen, pero no se limitan a, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, y similares.

60 El término “cicloalquilo C_3-C_n ” en el que n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, representa ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término “sustituido opcionalmente” se refiere a desde cero hasta cuatro sustituyentes, en los que los sustituyentes se seleccionan cada uno independientemente. Cada uno de los sustituyentes seleccionados independientemente puede ser iguales o diferente de los otros sustituyentes.

Tal como se usa en el presente documento el término “arilo” se refiere a un sistema de anillos carbocíclico mono o

bicíclico opcionalmente sustituido que tiene uno o dos anillos aromáticos incluyendo, pero sin limitarse a, fenilo, bencilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo, y similares. "Ariilo opcionalmente sustituido" incluye compuestos de ariilo que tienen desde cero hasta cuatro sustituyentes, y "ariilo sustituido" incluye compuestos de ariilo que tienen uno o más sustituyentes. El término (alquil C₅-C₈) se refiere a cualquier grupo ariilo que está unido al resto parental a través del grupo alquilo.

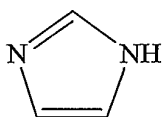
El término "grupo heterocíclico" se refiere a un sistema de anillos carbocíclico mono o bicíclico opcionalmente sustituido que contiene desde uno hasta tres heteroátomos, en el que los heteroátomos se seleccionan del grupo que consiste en oxígeno, azufre y nitrógeno.

Tal como se usa en el presente documento el término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillos carbocíclico mono o bicíclico opcionalmente sustituido que tiene uno o dos anillos aromáticos que contienen desde uno hasta tres heteroátomos e incluye, pero no se limita a, furilo, tienilo, piridilo y similares.

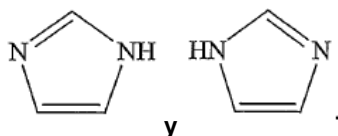
El término "bicíclico" representa un anillo de carbonos bicíclico condensado o en puente de 7 a 12 miembros estable o bien saturado o bien insaturado. El anillo bicíclico puede unirse a cualquier átomo de carbono que permita una estructura estable. El término incluye, pero no se limita a, naftilo, dicitclohexilo, dicitclohexenilo, y similares.

Los compuestos de la presente invención contienen uno o más centros asimétricos en la molécula. Según la presente invención, se entiende que una estructura que no designa la estereoquímica abarca todos los diversos isómeros ópticos, así como mezclas racémicas de los mismos.

Los compuestos de la presente invención pueden existir en formas tautoméricas y la invención incluye ambas mezclas y tautómeros individuales separados. Por ejemplo, la siguiente estructura:



se entiende que representa una mezcla de las estructuras:



El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que conservan las propiedades y la eficacia biológica de los compuestos de la presente invención y que no son indeseables desde el punto de vista biológico o de otro modo. En muchos casos, los compuestos de la presente invención pueden formar sales de ácido y/o base en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

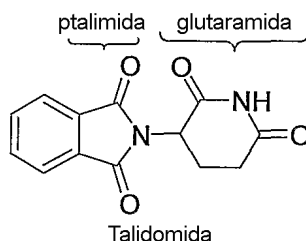
Pueden prepararse sales de adición de base farmacéuticamente aceptables a partir de bases orgánicas e inorgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen a modo de ejemplo únicamente, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, tales como alquilaminas, dialquilaminas, trialquilaminas, alquilaminas sustituidas, di(alquil sustituido) aminas, tri(alquil sustituido) aminas, alquenilaminas, dialquenilaminas, trialquenilaminas, alquenilaminas sustituidas, di(alquenil sustituido) aminas, tri(alquenil sustituido) aminas, cicloalquilaminas, di(cicloalquil)aminas, tri(cicloalquil)aminas, cicloalquilaminas sustituidas, cicloalquilamina disustituida, cicloalquilaminas trisustituidas, cicloalquenilaminas, di(cicloalquenil)aminas, tri(cicloalquenil)aminas, cicloalquenilaminas sustituidas, cicloalquenilamina disustituida, cicloalquenilaminas trisustituidas, arilaminas, diarilaminas, triarilaminas, heteroarilaminas, diheteroarilaminas, triheteroarilaminas, aminas heterocíclicas, aminas diheterocíclicas, aminas triheterocíclicas, di- y tri-aminas mixtas donde al menos dos de los sustituyentes en la amina son diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, ariilo, heteroarilo, heterocíclico, y similares. También se incluyen aminas donde los dos o tres sustituyentes, junto con el nitrógeno de amino, forman un grupo heterocíclico o heteroarilo. Los ejemplos de aminas adecuadas incluyen, a modo de ejemplo únicamente, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, tri(iso-propil)amina, tri(n-propil)amina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, trometamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, N-alquilglucaminas, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, morfolina, N-etilpiperidina, y similares. También debe entenderse que otros derivados de ácido carboxílico serían útiles en la práctica de esta invención, por ejemplo, amidas de ácido carboxílico, incluyendo carboxamidas, carboxamidas de alquilo inferior, dialquilcarboxamidas, y similares.

Pueden prepararse sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables a partir de ácidos orgánicos e

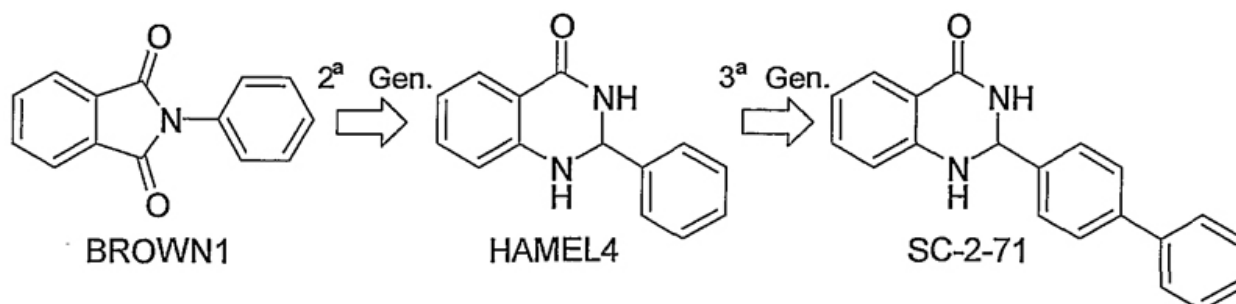
inorgánicos. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, y similares.

Realizaciones de la invención

La talidomida (mostrada a continuación) se desarrolló en los años 1950 por Chemie Grünenthal de Alemania como sedante no tóxico. Se usó ampliamente para prevenir las náuseas matutinas en mujeres embarazadas.



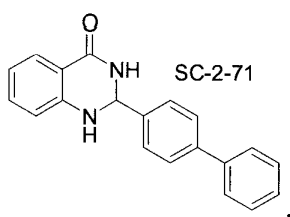
Además de sus efectos sedantes en seres humanos, se notificó una asociación de defectos teratogénicos en las extremidades a partir del uso maternal de talidomida. Aparte de estos efectos teratogénicos graves sobre el feto, el fármaco sí tiene valor terapéutico: (1) por su efecto inmunosupresor en el tratamiento de la enfermedad de injerto frente a huésped; (2) en el tratamiento de la lepra; y (3) para la dermatosis inflamatoria. Además, la talidomida tiene actividad antiangiogénica significativa, y como resultado, está encontrando un uso clínico más amplio en el tratamiento de diversos cánceres, particularmente en cánceres que tienen mal pronóstico debido a la densidad de microvasos (por ejemplo mieloma múltiple y cáncer de próstata). Se han descrito previamente derivados antiangiogénicos de talidomida, que incluyen un derivado en el que el anillo de glutaramida que se sustituye con un grupo fenilo, lo que conduce a un compuesto activo denominado, BROWN1.



Se concibieron análogos de segunda generación mediante una expansión de anillo del anillo de ptalimida, que dio como resultado la quinazolinona notificada anteriormente (HAMEL4; véase la solicitud PCT publicada n.º WO 02/086078A3). HAMEL4 se ha optimizado ahora adicionalmente en el presente documento para generar el compuesto novedoso SC-2-71, que tal como se da a conocer en el presente documento tiene eficacia potenciada (en relación con HAMEL4) contra diversos cánceres, incluyendo tumores sólidos tales como el cáncer de colon.

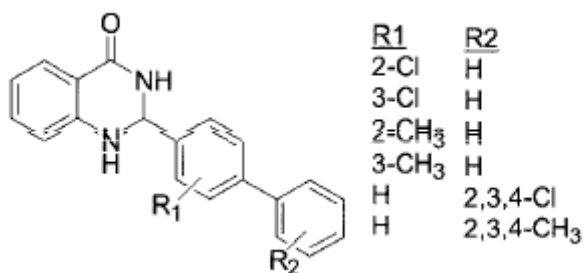
Según la presente invención, se proporciona un compuesto que tiene la estructura general I tal como se definió anteriormente.

En una realización, el compuesto es



o un análogo, derivado o modificación del mismo tal como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto, el análogo, derivado o modificación de SC-2-71 es:



Sustitución de arilo (bifenilo)

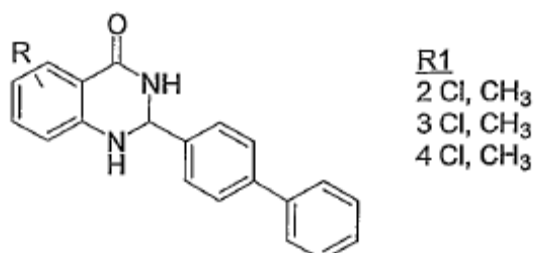
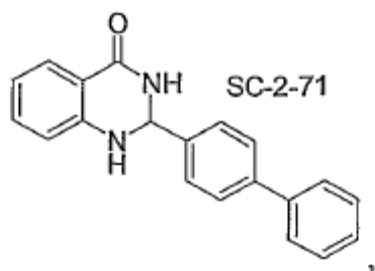
5

En otro aspecto, R₁ y R₂ son independientemente mono-, di- o tri-cloro y mono-, di- y tri-metilo (CH₃).

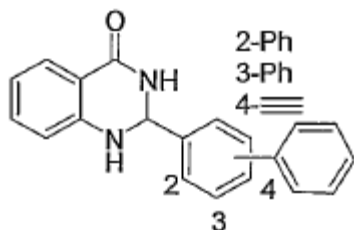
También se da a conocer un método de tratamiento de una enfermedad o estado relacionado con angiogénesis mediante la administración de un compuesto o composición que inhibe la angiogénesis. Más particularmente, se da a conocer un método de inhibición la angiogénesis no deseada en un vertebrado de sangre caliente, incluyendo seres humanos. En un aspecto, la angiogénesis no deseada está asociada con tumores sólidos, tal como cáncer de colon. El método comprende la etapa de administrar al ser humano o animal una composición que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la estructura general I tal como se definió anteriormente.

10

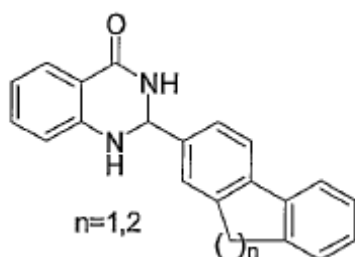
15 Los compuestos dados a conocer en el presente documento incluyen:



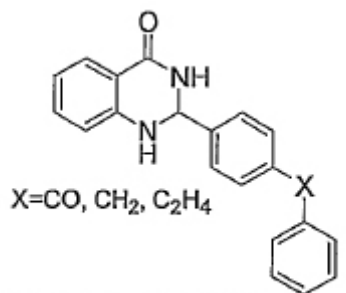
20 Sustitución de arilo (anillo condensado),



Isoésteres/análogos de fenilo,

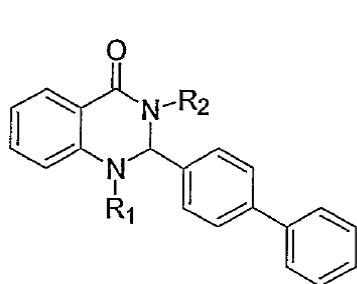


Análogos rígidos de bifenilo



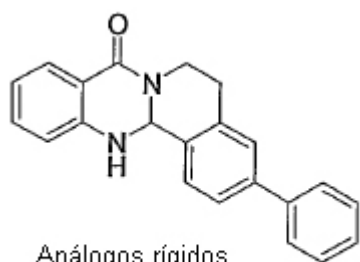
Inserción de espaciador ,

5



<u>R1</u>	<u>R2</u>
H	CH ₃
H	Ph
CH ₃	CH ₃
CH ₃	H
CH ₃	Ph
Ph	H
Ph	CH ₃
Ph	Ph

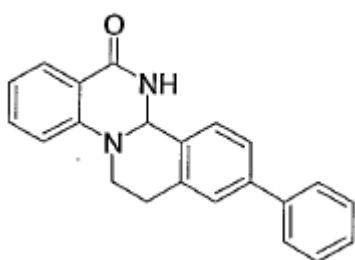
Sustituciones de amida/amina ,



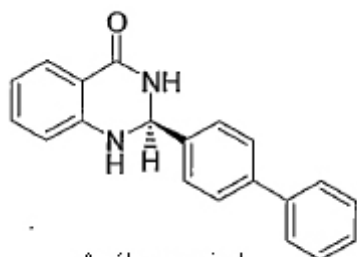
Análogos rígidos
(unidos a amida)

,

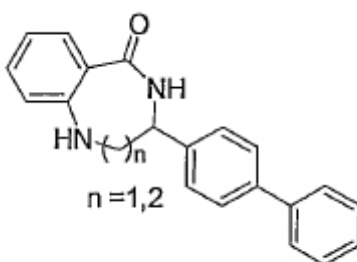
10



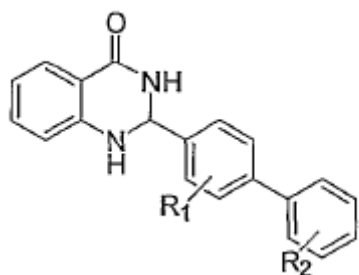
Análogos rígidos (amina) ,



Análogo quiral



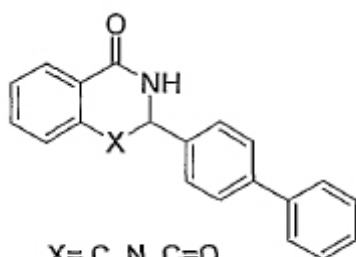
Expansion de anillo



<u>R1</u>	<u>R2</u>
2-Cl	H
3-Cl	H
2-CH ₃	H
3-CH ₃	H
H	2,3,4-Cl
H	2,3,4-CH ₃

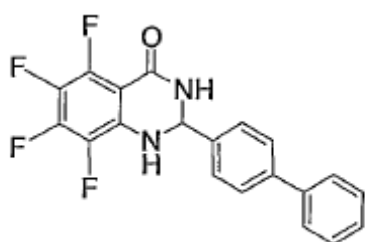
5

Sustitución de arilo (bifenilo)



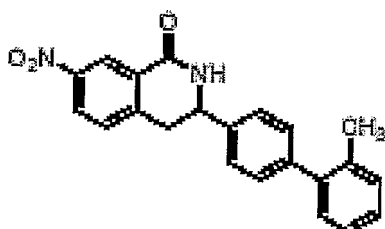
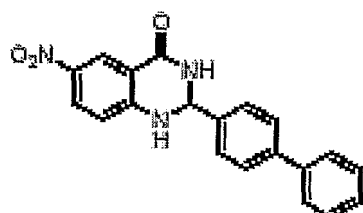
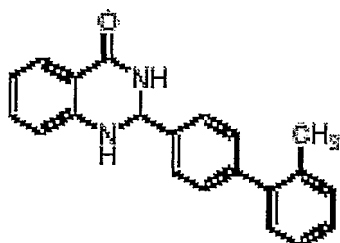
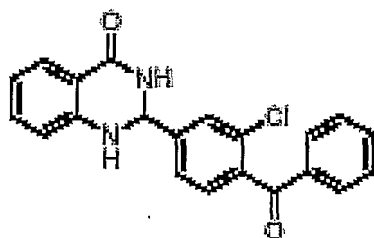
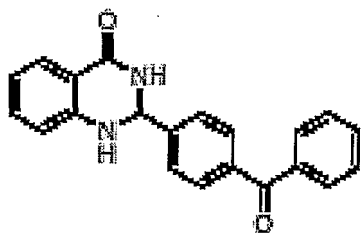
X= C, N, C=O

Homólogos de grupo



Tetrafluoro

10



y

Según una realización, los compuestos de la presente invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas combinando los compuestos con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Estas formulaciones pueden administrarse por vías convencionales. En general, las combinaciones pueden administrarse por vía tópica, transdérmica, oral, rectal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular).

Cuando se administran por vía oral, los compuestos se administran como disolución líquida, polvo, comprimido, cápsula o pastilla para chupar. Los compuestos pueden usarse en combinación con uno o más aditivos o excipientes farmacéuticos convencionales usados en la preparación de comprimidos, cápsulas, pastillas para chupar u otras formas que pueden administrarse por vía oral.

Cuando se administran por vía parenteral, y más preferiblemente mediante inyección intravenosa, los derivados de la presente invención pueden mezclarse con soluciones salinas y/o disoluciones i.v. convencionales. Además, las combinaciones pueden incorporarse en polímeros biodegradables que permiten la liberación sostenida del compuesto, y en una realización el vehículo de administración se implanta en las proximidades de donde se desea la administración del fármaco, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El médico experto conoce polímeros biodegradables adecuados para su uso con la presente invención y se describen en detalle, por ejemplo, en Brem *et al.*, J. Neurosurg. 74:441-446 (1991).

La dosificación del compuesto activo dependerá del estado que va a tratarse, del compuesto particular y de otros factores clínicos tales como el peso y el estado del ser humano o animal y de la vía de administración del compuesto. Se entiende que la presente invención tiene aplicación para uso tanto humano como veterinario. En una realización que se refiere a la administración oral a seres humanos, generalmente es suficiente una dosificación de entre aproximadamente 0,1 y 300 mg/kg/día, o de entre aproximadamente 0,5 y 50 mg/kg/día, o de entre aproximadamente 1 y 10 mg/kg/día.

Debe entenderse que además de los compuestos antiangiogénicos activos de fórmula I, las composiciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica incluyendo agentes de solubilización, cargas inertes, diluyentes, excipientes y agentes aromatizantes.

Una composición que comprende un compuesto de fórmula I puede usarse para inhibir la angiogénesis. En un aspecto, la composición se administra para tratar una enfermedad, trastorno o estado asociado con angiogénesis excesiva o no deseada, tal como asociado con tumores sólidos. Más particularmente, la densidad de microvasos (MVD) o el recuento de microvasos dentro de un tumor es un marcador de angiogénesis estudiado ampliamente. Los pacientes cuyos tumores tienen una MVD alta tienen una supervivencia más corta que aquellos con una MVD baja. De hecho, se ha encontrado una correlación de densidad de microvasos aumentada y mal pronóstico para varios tumores sólidos devastadores incluyendo el cáncer colorrectal (Saclarides *et al.*, Diseases of the Colon & Rectum. 37(9):921-6, 1994).

Un compuesto de la invención puede usarse para inhibir una enfermedad, trastorno o estado que está asociado con angiogénesis o densidad de microvasos aumentada. Los compuestos que tienen la estructura general de fórmula I que muestran actividad anticancerosa y antiangiogénica se usan para inhibir el crecimiento de tumores sólidos.

Se evaluaron los efectos de 123 agentes anticancerosos en 60 líneas celulares de cáncer en el examen de fármacos anticancerosos del NCI para determinar la actividad contra las líneas celulares con p53 de tipo natural o mutante (véanse los ejemplos). Las líneas celulares con p53 mutante fueron menos sensibles a inhibidores de la topoisomerasa, antimetabolitos y agentes de reticulación de ADN, en comparación con células con p53 normal. El grupo de agentes quimioterápicos que difería a este respecto incluyó agentes antimicrotúbulos. Estos resultados *in vitro* concuerdan con los resultados clínicos (Safran, *et al.*, Cancer, 78: 1203-1210, 1996). Por tanto, se prevé que los compuestos de fórmula I pueden tener eficacia potenciada contra cánceres que expresan una p53 alterada.

Los compuestos de la presente invención son útiles como agentes antiproliferativos contra células cancerosas. En un aspecto, las células cancerosas incluyen, pero no se limitan a, células de cáncer de colon, mieloma múltiple, cáncer de mama, leucemia, cáncer de cuello uterino, del sistema nervioso central, carcinoma de células no pequeñas, melanoma, cáncer de ovario y cáncer de próstata. En un aspecto, el cáncer es un tumor sólido. En otro aspecto, el cáncer es una leucemia.

La eficacia de los compuestos de la invención en la inhibición del crecimiento tumoral puede medirse mediante numerosas técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Tales técnicas incluyen el uso de compuestos radiomarcados, numerosas técnicas de obtención de imágenes radiográficas, así como medición física.

Los compuestos de la invención pueden administrarse a un sujeto en una composición farmacéutica que comprende además un agente quimioterápico conocido. Los expertos habituales en la técnica conocen agentes quimioterápicos así como las dosis que deben usarse.

Otra enfermedad que puede tratarse es la artritis reumatoide. Se cree que los vasos sanguíneos en el revestimiento sinovial de las articulaciones experimentan angiogénesis. Además de formar nuevas redes vasculares, las células endoteliales liberan factores y especies reactivas de oxígeno que conducen a crecimiento de queratitis vascular y destrucción de cartilago. Los factores implicados en angiogénesis pueden contribuir activamente a, y ayudan a mantener, el estado inflamado de manera crónica de la artritis reumatoide.

También se prevé que los compuestos de la presente invención tienen uso en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades o estados que están relacionados con angiogénesis, incluyendo retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolenticular, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de vitamina A, uso excesivo de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, pterigión, queratoconjuntivitis seca, síndrome de Sjögren, acné rosácea, filectenulosis, sífilis, infecciones por micobacterias, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones

por herpes simple, infecciones por herpes zóster, infecciones protozoarias, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratólisis marginal, traumatismo, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, sarcoidosis de Wegener, escleritis, enfermedad de Stevens-Johnson, penfigoide, queratotomía radial y rechazo de injerto de córnea. En otra realización, las enfermedades asociadas con la neovascularización de córnea puede tratarse administrando una composición que comprende un compuesto de fórmula I. Las enfermedades asociadas con neovascularización retiniana/coroidal incluyen, pero no se limitan a, retinopatía diabética, degeneración macular, anemia drepanocítica, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástico, enfermedad de Paget, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva carotídea, uveítis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía del prematuro, enfermedad de Eales, enfermedad de Behcet, infecciones que producen una retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, enfermedad de Best, miopía, foveas papilares, enfermedad de Stargart, pars planitis, desprendimiento de retina crónico, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismo y complicaciones tras láser.

Se ha encontrado que los compuestos de fórmula I tal como se describe en el presente documento muestran actividad antimicrotúbulos.

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la presente invención. Más particularmente, tales compuestos pueden formularse como composiciones farmacéuticas que usan portadores, cargas, agentes de solubilización y estabilizadores farmacéuticamente aceptables convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, tal como se describe en el presente documento, se usa para administrar el compuesto apropiado a un sujeto.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención se administran a un sujeto que lo necesita mediante varias vías y medios incluyendo, pero sin limitarse a, medios tópicos, orales, bucales, intravenosos, intramusculares, intraarteriales, intramedulares, intratecales, intraventriculares, transdérmicos, subcutáneos, intraperitoneales, intranasales, enterales, tópicos, sublinguales, vaginales, oftálmicos, pulmonares o rectales. La vía oral se emplea normalmente para la mayoría de los estados que requieren los compuestos de la invención. Se da preferencia a la infusión o inyección intravenosa para los tratamientos agudos. Para los regímenes de mantenimiento, se prefiere a vía oral o parenteral, por ejemplo intramuscular o subcutánea.

Según una realización, se proporciona una composición que comprende un compuesto de la invención y albúmina, más particularmente, la composición comprende un compuesto de la presente invención, un portador farmacéuticamente aceptable y albúmina al 0,1-1,0%. La albúmina funciona como tampón y mejora la solubilidad de los compuestos. En un aspecto, no se añade albúmina.

En una realización, las composiciones farmacéuticas útiles para poner en práctica la invención pueden administrarse para suministrar una dosis de entre 1 ng/kg/día y 100 mg/kg/día. En otra realización, las composiciones farmacéuticas útiles para poner en práctica la invención pueden administrarse para suministrar una dosis de entre 1 ng/kg/día y 100 g/kg/día.

Los portadores farmacéuticamente aceptables que son útiles incluyen, pero no se limitan a, glicerol, agua, solución salina, etanol y otras disoluciones de sal farmacéuticamente aceptable tales como fosfatos y sales de ácidos orgánicos. Ejemplos de estos y otros portadores farmacéuticamente aceptables se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (1991, Mack Publicación Co., New Jersey).

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse, envasarse o venderse en forma de una suspensión o disolución acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta suspensión o disolución puede formularse según la técnica conocida, y puede comprender, además del principio activo, componentes adicionales tales como los agentes dispersantes, agentes humectantes o agentes de suspensión descritos en el presente documento. Tales formulaciones inyectables estériles pueden prepararse usando un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen, pero no se limitan a, solución de Ringer, disolución isotónica de cloruro de sodio y aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos.

Los compuestos que se identifican usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento pueden formularse y administrarse a un sujeto para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades y trastornos descritos en el presente documento. Sin embargo, no debe interpretarse que el uso de los compuestos de la invención incluye sólo las enfermedades y trastornos descritos en el presente documento. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier método conocido o desarrollado más adelante en la técnica de farmacología. En general, tales métodos de preparación incluyen la etapa de llevar el principio activo en asociación con un portador o uno o más componentes adicionales y entonces, si es necesario o deseable, conformar o envasar el producto para dar una unidad deseada de una sola dosis o de múltiples dosis.

Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se refieren principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración ética a seres humanos, el experto en la técnica entenderá que tales composiciones son adecuadas en general para su administración a animales de todas clases.

Se entiende bien la modificación de las composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a seres humanos con el fin de hacer que las composiciones sean adecuadas para su administración a diversos animales, y el farmacólogo veterinario experto habitual puede diseñar y realizar una modificación de este tipo sin experimentación excesiva, meramente habitual. Los sujetos a los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero no se limitan a, seres humanos y otros primates, y mamíferos, incluyendo mamíferos comercialmente relevantes tales como ganado, cerdos, caballos, cabras, gatos y perros.

Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, envasarse o venderse a granel, como una dosis unitaria individual o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Tal como se usa en el presente documento, una "dosis unitaria" es una cantidad diferenciada de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del principio activo. La cantidad del principio activo generalmente es igual a la dosificación del principio que se administraría a un sujeto o una fracción conveniente de tal dosificación tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de tal dosificación.

Las cantidades relativas del principio activo, el portador farmacéuticamente aceptable y cualquier componente adicional en una composición farmacéutica de la invención variarán, dependiendo de la identidad, el tamaño y el estado del sujeto tratado y dependen adicionalmente de la vía mediante la que va a administrarse la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre el 0,1% y el 100% (p/p) del principio activo.

Además del principio activo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender además uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales. Los agentes adicionales contemplados particularmente incluyen antieméticos y eliminadores de radicales libres tales como eliminadores de radicales libres de cianuro y cianato.

Pueden obtenerse formulaciones de liberación controlada o sostenida de una composición farmacéutica de la invención usando tecnología convencional.

En algunos casos, las formas de dosificación que van a usarse pueden proporcionarse como liberación lenta o controlada de uno o más principios activos usando en ellas, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, otras matrices de polímero, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos de múltiples capas, micropartículas, liposomas o microesferas o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en diversas proporciones. Las formulaciones de liberación controlada adecuadas conocidas por los expertos habituales en la técnica, incluyendo las descritas en el presente documento, pueden seleccionarse fácilmente para su uso con las composiciones farmacéuticas de la invención. Por tanto, en la presente invención están englobadas formas de dosificación unitaria individuales para administración oral, tales como comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina y comprimidos oblongos que están adaptados para liberación controlada.

La mayoría de las formulaciones de liberación controlada se diseñan para liberar inicialmente una cantidad de fármaco que produce rápidamente el efecto terapéutico deseado y liberar gradual y continuamente otras cantidades del fármaco para mantener este nivel de efecto terapéutico a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Con el fin de mantener este nivel constante de fármaco en el organismo, el fármaco debe liberarse de la forma de dosificación a una tasa que sustituirá a la cantidad de fármaco que está metabolizándose y excretándose del cuerpo.

La liberación controlada de un principio activo puede estimularse mediante diversos inductores, por ejemplo pH, temperatura, enzimas, agua u otros compuestos o condiciones fisiológicas.

Pueden prepararse formulaciones en polvo y granulares de una preparación farmacéutica de la invención usando métodos conocidos. Tales formulaciones pueden administrarse directamente a un sujeto, usadas, por ejemplo, para formar comprimidos, para llenar cápsulas o para preparar una suspensión o disolución acuosa u oleosa mediante la adición de un vehículo acuoso u oleoso a la misma. Cada una de estas formulaciones puede comprender además uno o más agentes dispersantes o humectantes, un agente de suspensión y un conservante. También pueden incluirse en estas formulaciones excipientes adicionales, tales como cargas y agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

Tal como se usa en el presente documento, un líquido "oleoso" es uno que comprende una molécula líquida que contiene carbono y que muestra un carácter menos polar que el agua.

Una formulación de una composición farmacéutica de la invención adecuada para administración oral puede prepararse, envasarse o venderse en forma de una unidad de dosificación sólida diferenciada incluyendo, pero sin limitarse a, un comprimido, una cápsula dura o blanda, un sello, un trocisco o una pastilla para chupar, que

contienen cada uno una cantidad predeterminada del principio activo. Otras formulaciones adecuadas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, una formulación en polvo o granular, una suspensión acuosa u oleosa, una disolución acuosa u oleosa, una pasta, un gel, una pasta de dientes, un elixir bucal, un recubrimiento, un enjuague bucal o una emulsión. Los términos enjuague bucal y elixir bucal se usan de manera intercambiable en el presente documento.

Un comprimido que comprende el principio activo puede obtenerse, por ejemplo, comprimiendo o moldeando el principio activo, opcionalmente con uno o más componentes adicionales. Pueden prepararse comprimidos fabricados por compresión comprimiendo, en un dispositivo adecuado, el principio activo en forma de flujo libre tal como una preparación en polvo o granular, mezclándolo adicionalmente con uno o más de un aglutinante, un lubricante, un excipiente, un agente tensioactivo y un agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden obtenerse moldeando, en un dispositivo adecuado, una mezcla del principio activo, un portador farmacéuticamente aceptable y al menos suficiente líquido para humedecer la mezcla. Los excipientes farmacéuticamente aceptables usados en la fabricación de comprimidos incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, agentes de granulación y disgregantes, agentes de unión y agentes lubricantes. Los agentes dispersantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, almidón de patata y glicolato sódico de almidón. Los agentes tensioactivos conocidos incluyen, pero no se limitan a, laurilsulfato de sodio. Los diluyentes conocidos incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, celulosa microcristalina, fosfato de calcio, hidrogenofosfato de calcio y fosfato de sodio. Los agentes de granulación y disgregantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, almidón de maíz y ácido algínico. Los agentes de unión conocidos incluyen, pero no se limitan a, gelatina, goma arábiga, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona e hidroxipropilmetilcelulosa. Los agentes lubricantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, ácido esteárico, sílice y talco.

Los comprimidos pueden no recubrirse o pueden recubrirse usando métodos conocidos para lograr la disgregación en el tracto gastrointestinal de un sujeto, proporcionando así liberación y absorción sostenida del principio activo. A modo de ejemplo, puede usarse un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo para recubrir comprimidos. Adicionalmente a modo de ejemplo, pueden recubrirse comprimidos usando métodos descritos en las patentes estadounidenses números 4.256.108; 4.160.452; y 4.265.874 para formar comprimidos de liberación controlada osmóticamente. Los comprimidos pueden comprender adicionalmente un agente edulcorante, un agente aromatizante, un agente colorante, un conservante o alguna combinación de éstos con el fin de proporcionar una preparación farmacéuticamente elegante y agradable.

Pueden obtenerse cápsulas duras que comprenden el principio activo usando una composición fisiológicamente degradable, tal como gelatina. Tales cápsulas duras comprenden el principio activo, y pueden comprender además componentes adicionales incluyendo, por ejemplo, un diluyente sólido inerte tal como carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín.

Pueden prepararse cápsulas de gelatina blanda que comprenden el principio activo usando una composición fisiológicamente degradable, tal como gelatina. Tales cápsulas blandas comprenden el principio activo, que puede mezclarse con agua o un medio oleoso tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las formulaciones líquidas de una composición farmacéutica de la invención que son adecuadas para administración oral, pueden prepararse, envasarse y venderse o bien en forma líquida o bien en forma de un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso.

Las formulaciones inyectables pueden prepararse, envasarse o venderse en una forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en recipientes de múltiples dosis que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, disoluciones, emulsiones en vehículos acuosos o aceitosos, pastas y formulaciones biodegradables o implantables de liberación sostenida. Tales formulaciones pueden comprender además uno o más componentes adicionales incluyendo, pero sin limitarse a, agentes de suspensión, estabilizadores o dispersantes. En una realización de una formulación para administración parenteral, el principio activo se proporciona en forma seca (es decir, en polvo o granular) para su reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de la administración parenteral de la composición reconstituída.

Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, envasarse o venderse en una formulación adecuada para administración bucal. Tales formulaciones pueden estar, por ejemplo, en forma de comprimidos o pastillas para chupar obtenidas usando métodos convencionales, y pueden contener, por ejemplo, del 0,1 al 20% (p/p) de principio activo, comprendiendo el resto una composición que puede disolverse o degradarse por vía oral y, opcionalmente, uno o más de los componentes adicionales descritos en el presente documento. Alternativamente, las formulaciones adecuadas para administración bucal pueden comprender un polvo o una suspensión o disolución en aerosol o atomizada que comprende el principio activo. Tales formulaciones en polvo, en aerosol, cuando se dispersan, tienen preferiblemente un tamaño de partícula o gotita promedio en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 200 nanómetros, y pueden comprender uno o más de los componentes adicionales descritos en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, "componentes adicionales" incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes de granulación y disgregantes; agentes de unión; agentes lubricantes; agentes edulcorantes; agentes aromatizantes; agentes colorantes; conservantes, composiciones fisiológicamente degradables tales como gelatina; vehículos y disolventes acuosos; vehículos y disolventes oleosos; agentes de suspensión; agentes dispersantes o humectantes; agentes emulsionantes, demulcentes; tampones; sales; agentes espesantes; cargas; agentes emulsionantes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables. Véase Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

El compuesto puede administrarse a un sujeto con una frecuencia de hasta varias veces al día, o puede administrarse menos frecuentemente, tal como una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, o incluso con menos frecuencia, tal como una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos. La frecuencia de la dosis resultará fácilmente evidente para el experto en la técnica y dependerá de cualquier número de factores, tales como, pero sin limitarse a, el tipo y la gravedad de la enfermedad que está tratándose, el tipo y la edad del sujeto, etc.

La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Según una realización, se proporciona un kit para tratar a un sujeto que necesita de inmunomodulación. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano. En una realización, el kit comprende uno o más de los análogos de SIP de la presente invención y también puede incluir uno o más inmunosupresores conocidos. Estos agentes farmacéuticos pueden envasarse en una variedad de recipientes, por ejemplo, viales, tubos, placas con pocillos de microtitulación, botellas, y similares. Otros reactivos pueden incluirse en recipientes separados y proporcionarse con el kit; por ejemplo, muestras de control positivo, muestras de control negativo, tampones, medios de cultivo celular, etc. Los kits también incluirán instrucciones para su uso.

Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención está completamente adaptada para llevar a cabo los objetos y para obtener los fines y ventajas mencionados, así como los inherentes en ellos. La presente invención puede realizarse de otras formas específicas, por consiguiente, debe hacerse referencia a las reivindicaciones adjuntas, en lugar de a la memoria descriptiva anterior, tal como indica el alcance de la invención.

Ejemplos

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan para el fin únicamente de ilustración y la invención no debe interpretarse limitada a estos ejemplos.

Los compuestos fuera del alcance de las reivindicaciones se dan a conocer para fines de referencia

Ejemplo 1- SC-2-71 Efectos sobre la proliferación

Se evaluó SC-2-71 contra líneas celulares cultivadas humanas en el programa de desarrollo de fármacos anticancerosos del NCI. Los datos proporcionados a continuación en la tabla 2 revelan que SC-2-71 es un inhibidor potente de la proliferación de cáncer de colon oscilando las actividades antiproliferativas entre 68 nM y 4 μ M. Esto incluye la inhibición potente de células cancerosas de colon procedentes de tumores primarios, metástasis distales y líquido ascítico.

Tabla 2. Resumen de GI_{50} para líneas celulares de colon humanas tratadas con SC-2-71.

Compuesto	Datos de GI_{50} (μ M)						
	HT29	COLO205	HCC-2998	HCT-116	HCT-15	KM12	SW-620
SC-2-71	1	0,9	0,068	0,5	0,4	2	4
Vincristina ^a	0,11	0,12	0,11	0,12	0,14	0,12	0,11
5FU ^a	6,7	7,2	1,4	4,0	5,8	11,1	26,2

^aDatos del NCI. 5FU= 5-Fluorouracilo

También se inhibieron significativamente (GI_{50} = 500 nM) células tumorales de grado III (HCT 116) adicionales. En comparación con el 5-FU (aprobado actualmente para el cáncer de colon en estadio III), SC-2-71 fue significativamente más eficaz en la inhibición de líneas celulares de cáncer de colon humanas. SC-2-71 tuvo potencia similar en comparación con vincristina, un agente antimitótico bien conocido. Juntos, estos datos establecen que SC-2-71 tiene actividad antiproliferativa terapéuticamente relevante contra células de cáncer de colon cultivadas humanas.

Además, tal como se indica por los datos de GI_{50} obtenidos del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) y presentados en la figura 1, SC-2-71 también muestra toxicidad para un amplio intervalo de líneas celulares tumorales. Las barras más pequeñas representan las líneas celulares para las que SC-2-71 tuvo el efecto antiproliferativo más potente.

Son evidentes varios hallazgos interesantes. En primer lugar, SC-2-71 puede inhibir potentemente varios tipos de cánceres en el intervalo nanomolar (la menor GI_{50} (colon HCC2998) = 68 nanomolar). En segundo lugar, la respuesta diferencial a SC-2-71 por las líneas celulares de cáncer demuestra que SC-2-71 no es tóxico para ningún tipo celular (es decir varios GI_{50} son mayores de 100 μM). En tercer lugar, SC-2-71 no tiene que activarse metabólicamente como la talidomida para tener actividad anticancerosa, puesto que es directamente tóxica cuando se aplica a células cancerosas.

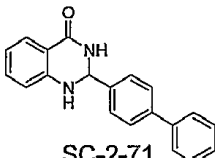
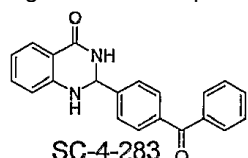
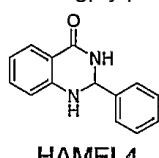
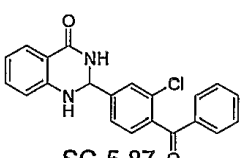
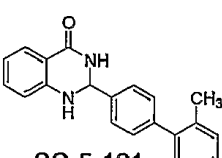
Los efectos de alteración de microtúbulos de SC-2-71 se detectaron en un examen fenotípico basado en células (figura 2). Se observó que SC-2-71 producía la reorganización espectacular de la red de microtúbulos de la interfase, de manera similar a los efectos de la vinblastina. Mientras que las células tratadas con vehículo mostraron una serie de microtúbulos filamentosos normal (figura 2), SC-2-71 produjo una pérdida dependiente de la concentración de microtúbulos celulares. Este efecto concuerda con los efectos observados a partir de otros despolimerizadores de microtúbulos. Además de la pérdida de microtúbulos, el tratamiento de las células con SC-2-71 dio como resultado una amplia micronucleación. También es un sello distintivo de los compuestos que alteran microtúbulos. La despolimerización de los microtúbulos en interfase es una respuesta clásica de las células a concentraciones relativamente altas de agentes de alteración de microtúbulos tales como los alcaloides de la vinca. Sin embargo, un gran número de pruebas sugieren que a las concentraciones citotóxicas eficaces menores, la capacidad de estos compuestos para interrumpir la dinámica normal de los microtúbulos (y de no producir cambios en el polímero de tubulina) produce la detención mitótica y la posterior apoptosis (Jordan, M.A., Curr. Med. Chem. 2:1-17, 2002).

La capacidad de SC-2-71 para iniciar la acumulación mitótica y la formación de husos mitóticos anómalos fue evidente tanto en células A-10 y como en HeLa a concentraciones que no producían cambios espectaculares en los microtúbulos en interfase. En células HeLa, SC-2-71 produce la formación de husos mitóticos anómalos y la acumulación mitótica a concentraciones micromolares bajas (figura 3).

Se determinaron los efectos de SC-2-71 sobre la progresión del ciclo celular usando técnicas de citometría de flujo. Se trataron células MDA-MB-435 con SC-2-71 3 μM durante 18 h, se tiñeron con reactivo de Krishan y se analizó el contenido en ADN. Los resultados (figura 4) muestran acumulación mitótica clara que concuerda con la interrupción de la función del huso mitótico normal y la detención mitótica.

Se evaluó la actividad antiproliferativa de SC-2-71 tal como se muestra en la tabla 4 usando el ensayo de SRB y se encontró que tenía buena potencia contra una línea celular de referencia, MDA-MB-435. Se sometieron a prueba análogos de SC-2-71 para determinar la capacidad para alterar microtúbulos y para determinar la potencia contra MDA-MB-435. Estos estudios de despolimerización de tubulina revelaron que SC-2-71 inhibía potencialmente la polimerización de tubulina (el 50% a 5 μM). En la tabla 4 se representan las actividades de varios análogos de SC-2-71 que tienen actividad de alteración de microtúbulos, tal como se define por una pérdida de más del 50% de microtúbulos a 30 μM . Los datos indican que determinados derivados de SC-2-71 tienen actividad antimicrotúbulos incluso superior (véanse los compuestos SC-5-87 y SC-5-121).

Tabla 4. Efectos de análogos en células que expresan Pgp y polimerización de tubulina

 SC-2-71  SC-4-283  HAMEL4  SC-5-87  SC-5-121				
Compuesto	Células MDA-MB-435 (IC_{50} μM)	Células NCI/ADR (que expresan Pgp) (IC_{50} μM)	Valor de Rr	Actividad de microtúbulos (% de despolimerización)
SC-2-71	0,61 $\pm$ 0,1	1,80 $\pm$ 0,11	2,95	50% a 5 μM
SC-4-283	0,90 $\pm$ 0,3			50% a 5 μM
HAMEL4	1,95 $\pm$ 0,4	3,19 $\pm$ 0,23	2,0	50% a 5 μM
SC-5-87	0,26 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,01	2,9	90% a 5 μM
SC-5-121	0,6 $\pm$ 0,1	0,88 $\pm$ 0,03	1,2	90% a 5 μM

La capacidad de los compuestos antimicrotúbulos/antiangiogénesis para eludir Pgp puede proporcionar ventajas significativas para terapia de tumores resistentes a fármacos. La capacidad de análogos de SC-2-71 para inhibir la proliferación de la línea celular que expresa Pgp NCI/ADR se demuestra por los datos proporcionados en la tabla 4. Los valores de resistencia relativa (Rr) pueden calcularse dividiendo la IC_{50} de la línea celular sensible entre la IC_{50} de la línea celular resistente. El valor de Rr para taxol en las líneas celulares NCI/ADR (que expresan Pgp) y MDA-MB-435 (deficientes en Pgp) es 827 (Tinley, *et al.*, Cancer Res. 63:1538-1549, 2003b). Los valores de Rr para los análogos de SC-2-71 actuales oscilan entre 1,3 y 2,9, lo que sugiere fuertemente que son malos sustratos para el transporte por Pgp, y por tanto deben ser agentes más eficaces contra la resistencia a múltiples fármacos mediada por Pgp.

Ejemplo 2- Análisis de campo molecular comparativo (CoMFA) de SC-2-71 y polimerización de tubulina.

CoMFA es una metodología de descubrimiento poderosa basada en ligando para identificar relaciones importantes entre datos biológicos y propiedades moleculares electrostáticas y estéricas. Se ha desarrollado CoMFA de β -tubulina que dio como resultado modelos que eran predictivos tanto de la polimerización de tubulina como de la unión a [3 H]colchicina para un gran conjunto de inhibidores de β -tubulina (Brown, *et al.*, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 8:6:1433-1441, 2000). Este estudio produjo los primeros modelos predictivos para múltiples tipos estructurales incluyendo combretastatinas, colchicina y podofilotoxina. Más recientemente, este modelo CoMFA se usó para identificar y predecir la actividad de despolimerización de β -tubulina de SC-2-71. El modelo CoMFA predijo que SC-2-71 sería un potente inhibidor de la polimerización de tubulina tal como se notificó anteriormente para el compuesto HAMEL4 parental (Hora *et al.*, Journal of Medicinal Chemistry, 43:23:4479-87, 2000).

SC-2-71 inhibe la polimerización de β -tubulina

Se sometieron a prueba análogos de SC-2-71 para determinar la capacidad para alterar microtúbulos, y para determinar la potencia contra MDA-MB-435. Estos estudios de despolimerización de tubulina revelaron que SC-2-71 inhibió potencialmente la polimerización de tubulina (el 50% a 5 μ M). En la tabla 4 se representan las actividades de varios análogos de SC-2-71 que tienen actividad de alteración de microtúbulos, tal como se define por una pérdida de más del 50% de microtúbulos a 30 μ M. Los datos indican que determinados derivados de SC-2-71 tienen actividad antimicrotúbulos incluso superior (véanse los compuestos SC-5-87 y SC-5-121).

Se cree que la actividad antiproliferativa de las líneas celulares que responden al tratamiento con SC-2-71 se debe a una diferencia en la expresión del isotipo de tubulina en las células que responden. De hecho, un estudio proteómico reveló que la tubulina de clase III (β III) está regulada por incremento en las células de cáncer de colon HT29 (Braguer *et al.*, British Journal of Cancer, 80(8):1162-8, 1999). Esta línea celular era muy sensible a SC-2-71 (GI_{50} = 1 μ M).

Ejemplo 3- Investigación del mecanismo de acción de SC-2-71

Existe una homología de secuencia (identidad) del 96% entre la secuencia de estructura por rayos X de β -tubulina (cerebro bovino) y β III (humana) (véase la figura 5). Con este alto nivel de homología, se emprendió el desarrollo de un modelo de proteína de la β III humana (figura 6B). Usando el módulo BIOPOLIMER dentro de SIBILO se ensartó la secuencia en la figura 5 en la estructura por rayos X notificada para crear el modelo de homología de la tubulina β III humana (figura 6). Entonces se tomó el modelo de homología de β III y se acopló de manera flexible SC-2-71 en él usando el módulo FlexX/C-Score dentro de SYBILO (FlexX se desarrolló en el Centro de Investigación Nacional Alemán para Tecnología de Información (GMD), y se distribuyó por Tripos Inc., St. Louis MO; www.tripos.com/software/flexx.html). SC-2-71 se acopla bien en la zona de mayor diferencia de aminoácidos cerca de los sitios de unión a taxol y colchicina (figura 6). El solapamiento de la homología con la estructura por rayos X reveló que cambios en aminoácidos residentes en la proteína β III cerca de los sitios de unión a taxol y colchicina podían conferir unión selectiva a SC-2-71. Se observó un enlace de hidrógeno importante entre la tirosina 36 y la parte de amina de SC-2-71. La comparación de las afinidades de unión previstas para β III-tubulina sugieren el orden de clasificación de SC-4-283 > SC-2-71. Este orden se confirmó experimentalmente mediante experimentos de despolimerización de tubulina en la tabla 4.

El modelo descrito en el presente documento se usó para adaptar y diseñar SC-4-283, un ligando de fotoafinidad potencial de SC-2-71 (figura 7). La cetona está dentro de algunos ángstroms de las cadenas laterales de His28, Arg369y Lys372. Por tanto, estos aminoácidos pueden proporcionar sitios de reacción potenciales para la formación de imina. Teniendo esto en cuenta, se sintetizó SC-4-283 como un marcador de fotoafinidad de benzofenona de SC-2-71 en un esfuerzo por elucidar y confirmar el dominio de unión de SC-2-71. Se evaluó SC-4-283 para determinar la inhibición de la polimerización de tubulina y se encontró que tenía actividad inhibidora mejorada en relación a SC-2-71 (tabla 4) tal como se había previsto. El modelo ha permitido 1) asignar prioridad de síntesis a nuevos ligandos basándose en la clasificación de las afinidades previstas del ligando a β -tubulina y 2) diseñar marcadores de afinidad potenciales y 3) proponer análisis de marcaje, digestión y secuencia para validar la hipótesis.

Ejemplo 4- Efectos inhibidores de SC-2-71 sobre la proliferación de células endoteliales *in vitro* e *in vivo*

Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, en el presente documento se describen estrategias y experimentos que están relacionados con el desarrollo de una estrategia anticancerosa de inhibir simultáneamente células endoteliales y cancerosas. Se han encontrado recientemente compuestos que tienen como objetivo microtúbulos celulares que muestran actividades antiangiogénicas y esto puede contribuir a sus eficacias antitumorales y anticancerosas (Miller, *et al.*, J. Clin. Oncol. 19:1195-1206, 2001). Los taxanos, taxol y docetaxel, vinblastina, vincristina y 2-metoxiestradiol tienen todos ellos actividad antiangiogénica *in vivo*. SC-2-71 inhibió la proliferación de células endoteliales de microvaso humanas (HMEC; IC_{50} de 20 μ M) y células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVEC; IC_{50} de 1,6 μ M) (véase la tabla 5). Entonces se examinó la capacidad de SC-2-71 para

inhibir la angiogénesis en un modelo *in vivo*.

Tabla 5. Efectos inhibidores de SC-2-71 sobre la proliferación de células endoteliales.

Compuesto	HMEC ^b IC ₅₀ (μM)	HUVEC ^c IC ₅₀ (μM)
SC-2-71	20 ± 5	1,66 ± 0,5
^a Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y los valores ± representan el EEM		
^b Células endoteliales de microvaso humanas		
^c Células endoteliales de vena umbilical humanas		

SC-2-71 inhibe el crecimiento de vasos sanguíneos en el modelo de membrana corioalantoidea (CAM) de pollo.

SC-2-71 (100 μM) inhibió un modelo translacional de crecimiento de vasos sanguíneos *in vivo* (CAM, figura 8, paneles B y C) en comparación con control (figura 8, panel A). Esto establece fuertemente que SC-2-71 tiene actividad antiangiogénica. Además, plantea la cuestión sobre el nivel de expresión de βIII-tubulina en HMEC.

Un resumen de los resultados obtenidos con SC-2-71 es tal como sigue:

1) SC-2-71 es un potente inhibidor de la proliferación de cáncer de colon oscilando las actividades antiproliferativas entre 68 nM y 4 μM;

2) En comparación con 5-FU (aprobado actualmente para el cáncer de colon en estadio III), SC-2-71 fue significativamente más eficaz en la inhibición de líneas celulares de cáncer de colon humanas;

3) SC-2-71 es un agente de despolimerización de microtúbulos;

4) SC-2-71 produjo una reorganización espectacular de las redes de microtúbulos en interfase, similar a los efectos de la vinblastina;

5) SC-2-71 produce la formación de husos mitóticos anómalos y la acumulación mitótica a concentraciones micromolares bajas;

6) SC-2-71 fue mal sustrato para el transporte por Pgp;

7) Se desarrolló un modelo de homología de la βIII-tubulina humana y se usó para 1) priorizar la síntesis y 2) diseñar un marcador de fotoafinidad potencial;

8) SC-4-283 se sintetizó como un marcador de fotoafinidad de benzofenona de SC-2-71 y se encontró que también era un potente inhibidor de la polimerización de tubulina;

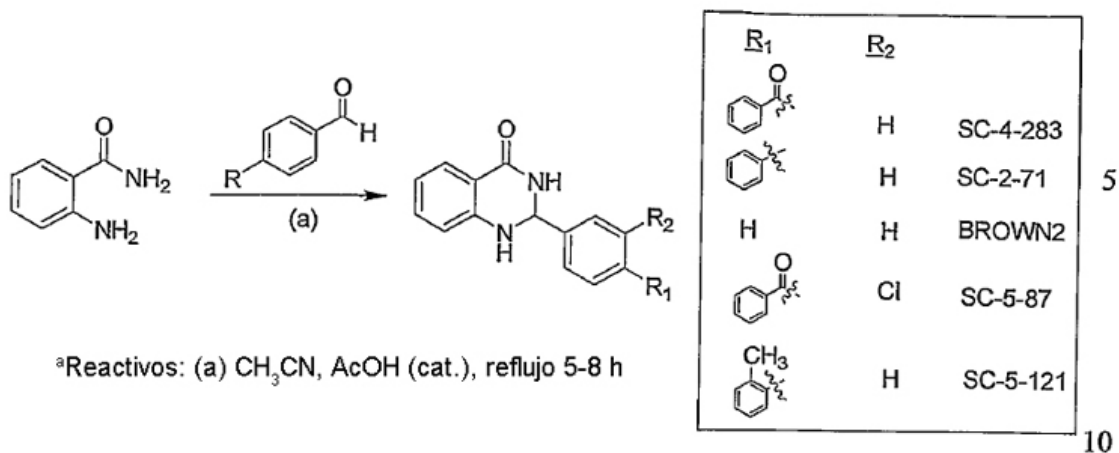
9) SC-2-71 inhibe la proliferación de células endoteliales de microvaso y vena umbilical humanas;

10) SC-2-71 inhibe el crecimiento de vasos sanguíneos en un modelo *in vivo* de angiogénesis.

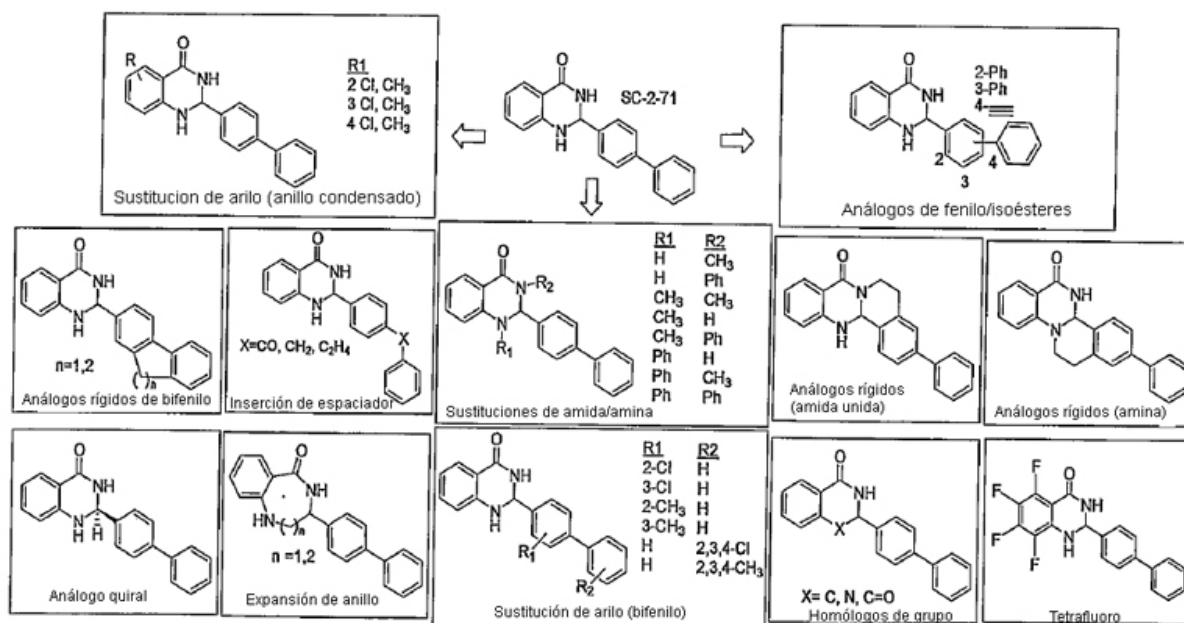
Ejemplo 5- Síntesis de SC-2-71 y compuestos derivados

Se sintetizaron SC-2-71 y análogos según los siguientes esquemas mediante la condensación de antranilamida con un derivado de benzaldehído sustituido de manera apropiada tal como se muestra en el esquema 1. La recristalización de los sólidos en bruto en etanol absoluto dio los productos puros enumerados.

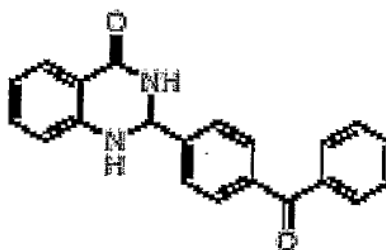
Esquema 1. Ruta de síntesis para SC-2-71 y análogos.



Compuestos diseñados para optimizar SC-2-71.



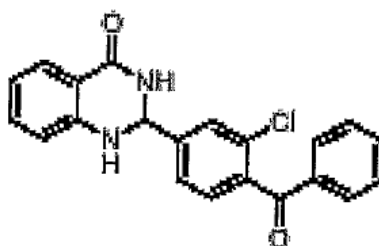
Otros compuestos incluyen:



SC-4-283

P.f. = 209-211°C

¹H-RMN; ¹³C-RMN, NCl: disminuida

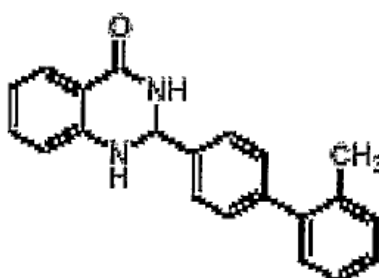


SC-5-87

P.f. = 177-179°C

5

¹H-RMN; ¹³C-RMN, NCI: 60 líneas celulares

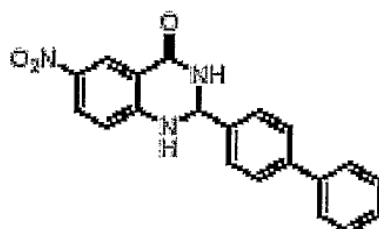


SC-5-121

P.f. = 169-171°C

10

¹H-RMN; ¹³C-RMN, NCI: 60 líneas celulares

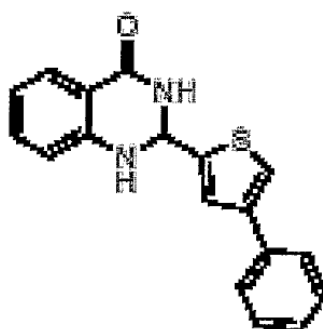


GMC-5-93

15

P.f. = 263-265°C

¹H-RMN; ¹³C-RMN, NCI: disminuida



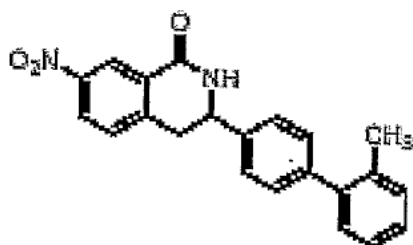
GMC-5-103

20

P.f. = 263-265°C

 ^1H -RMN; ^{13}C -RMN, NCI:

5 y

**GMC-5-193**

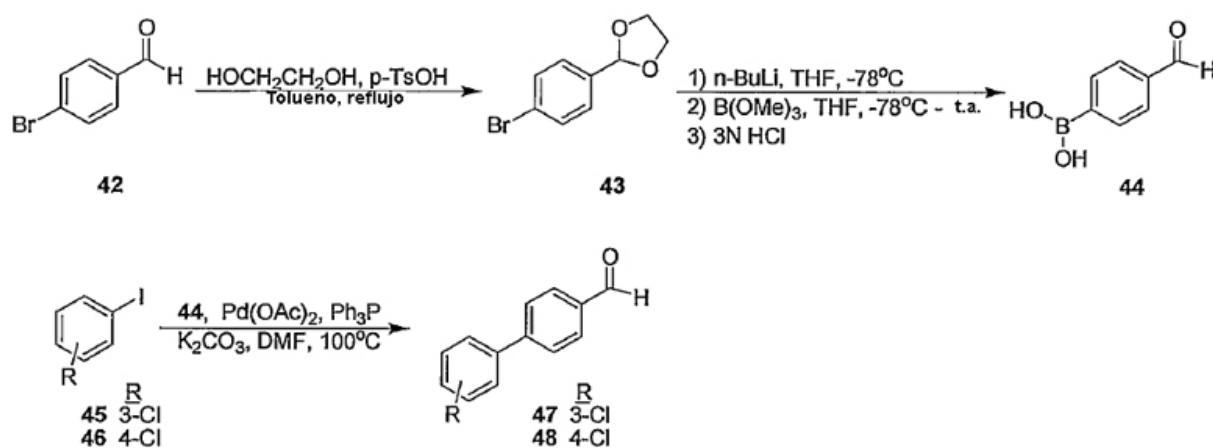
P.f. = 169-171°C

 ^1H -RMN; ^{13}C -RMN, NCI: 60 líneas celulares

Los compuestos descritos anteriormente tienen todos datos *in vitro* convincentes que demuestran su efectos contra cáncer de mama y de colon. Cada compuesto descrito en el presente documento es también un potente inhibidor de la tubulina y desplaza a la ^3H -colchicina (datos no mostrados).

Muchos de los aldehídos de partida necesarios para completar la síntesis de los análogos de SC-2-71 no están disponibles comercialmente. Se proporciona a continuación un breve resumen de la síntesis de varios de estos productos intermedios importantes.

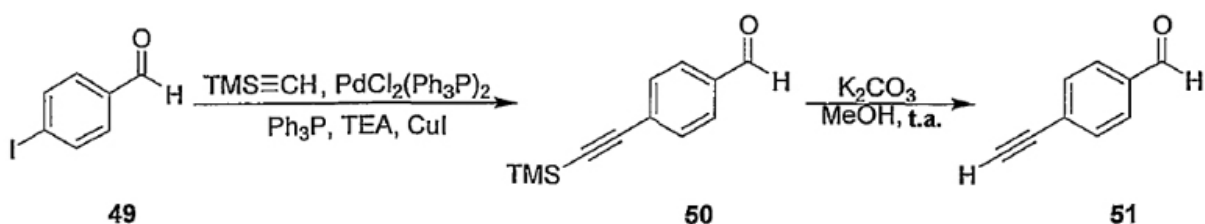
Esquema 2.



Ejemplo 6- Otras síntesis

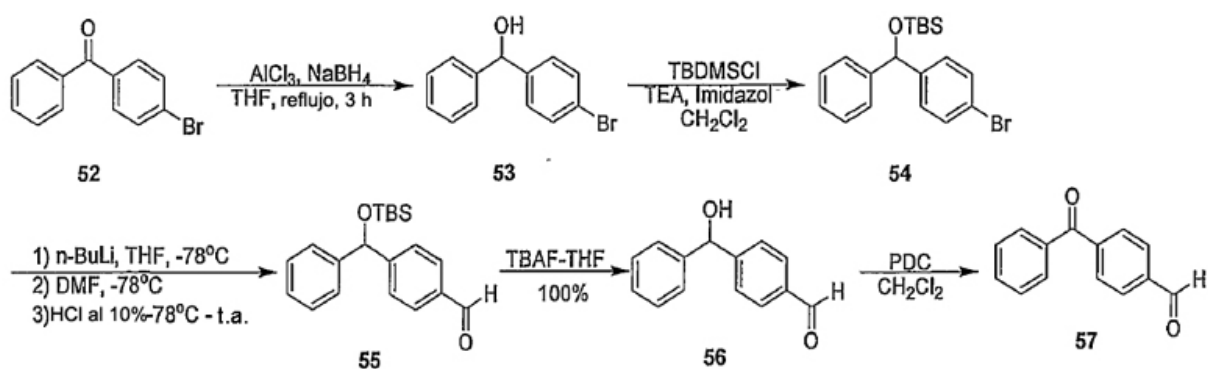
Se propone un método para la síntesis del producto intermedio de síntesis importante ácido 4-formilfenilborónico 44 con una protección con acetal de 4-bromobenzaldehído 42. El acetal resultante se convertirá en el trimetilborato y se desprotegerá para proporcionar el ácido borónico 44. Se obtendrán los aldehídos clave 47 y 48 en condiciones de acoplamiento de Suzuki usando 44 y el yodobenceno sustituido apropiado (esquema 2).

Esquema 3.

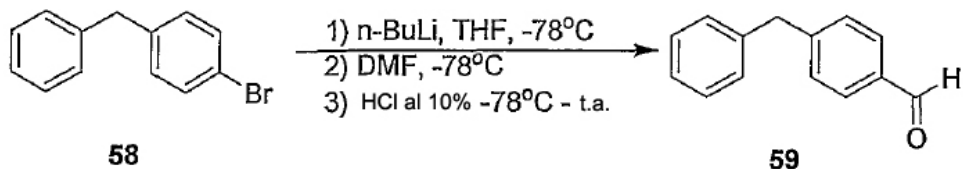


Se propone la síntesis de 4-etinilbenzaldehído 51 usando un acoplamiento de Castro-Stefens/Sonogashira modificado de 4-yodobenzaldehído y trimetilsilacetileno (esquema 3). El tratamiento de este aldehído con carbonato de potasio en metanol a temperatura ambiente debe proporcionar el aldehído 51. El plan para la síntesis de aldehído 57 (4-benzoilbenzaldehído) implica reducir 4-bromobenzofenona 52 y proteger el alcohol secundario resultante 53 con TBS para dar 54. Tras la formulación de 54, se desprotegerá y oxidará 56 para dar el aldehído final 57 (esquema 4). De esta manera, se planea instalar un grupo formilo sobre el bromuro de arilo 58 para dar 59 (esquema 5).

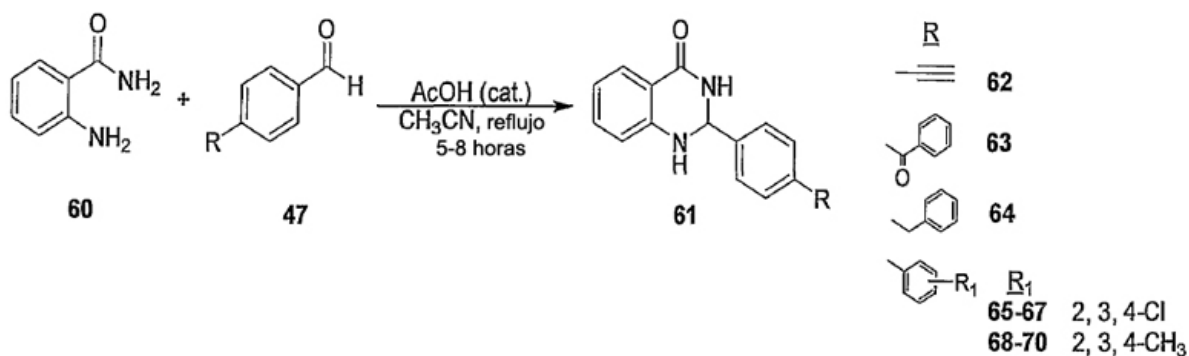
Esquema 4.



Esquema 5.

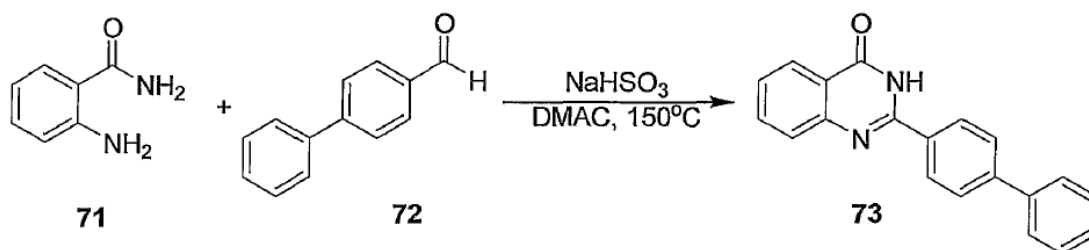


Esquema 6. Síntesis de los análogos de nueva generación 62-70.



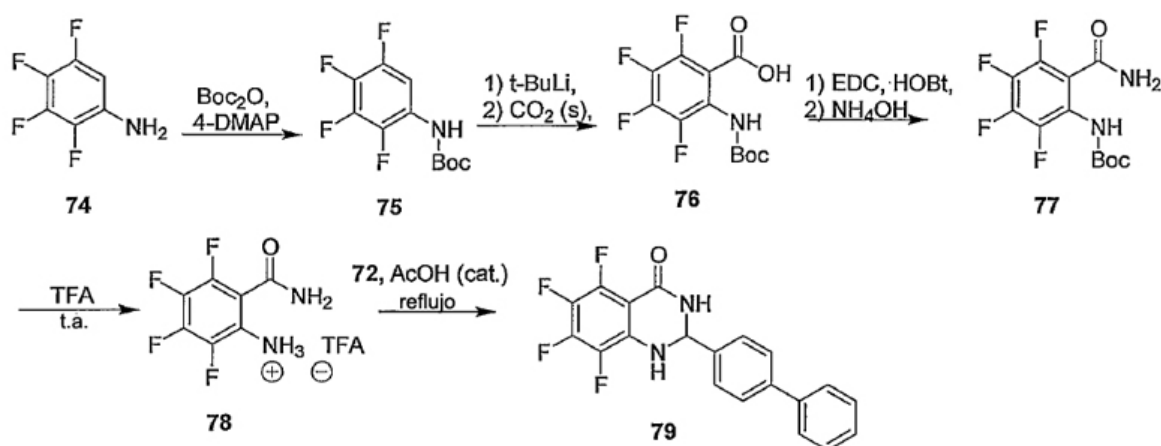
La síntesis de estos análogos se logrará usando el mismo procedimiento descrito para SC-2-71 (esquema 1). También requerirá la condensación del aldehído apropiado (tal como se explica resumidamente en secciones anteriores).

Esquema 7. Síntesis de quinazolinonas insaturadas



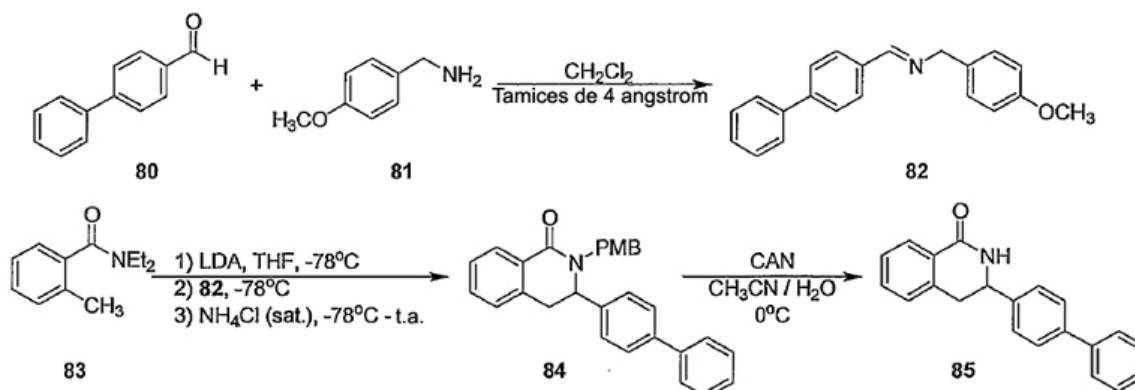
Se prevé una reacción de condensación en un recipiente de antranilamida 71 con 4-bifenilcarboxaldehído 72 para lograr este objetivo de síntesis (esquema 7). Esta reacción sería sumamente adaptable a la derivatización.

Esquema 8. Síntesis de tetrafluoroquinazolinona



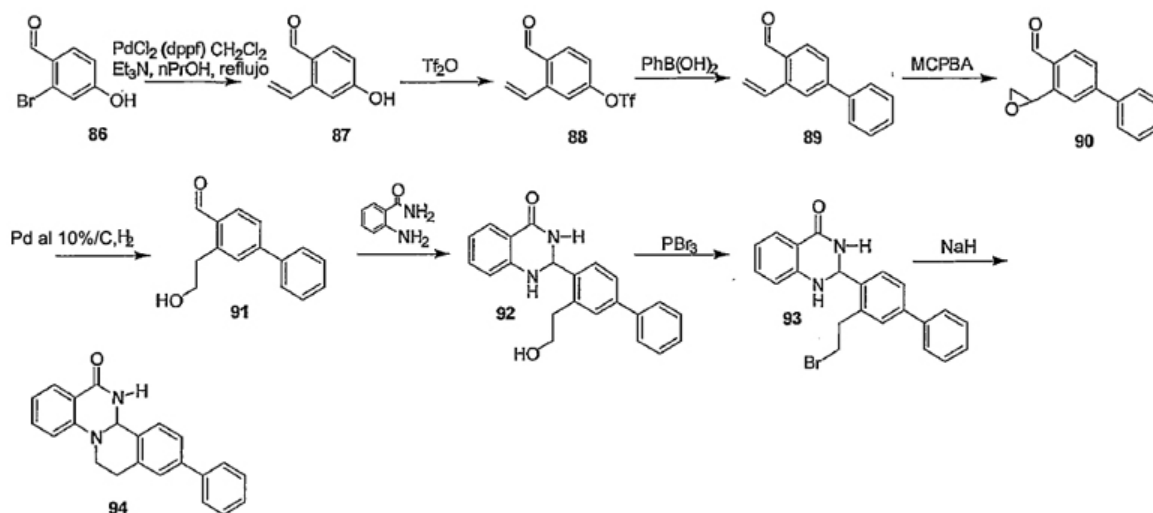
La tetrafluoroquinazolinona 79 se sintetizará usando una ortolitiación lateral de la amina protegida con Boc 75 (esquema 8). Tras la litiación, se formará 76 a partir de la adición de una suspensión de dióxido de carbono sólido en THF. Esto proporcionará el derivado de ácido antranílico protegido deseado 76. El ácido carboxílico resultante se convertirá en la amida 77 y se condensará con 4-bifenilcarboxaldehído para dar el compuesto final 79.

Esquema 9. Síntesis de isótero de carbono



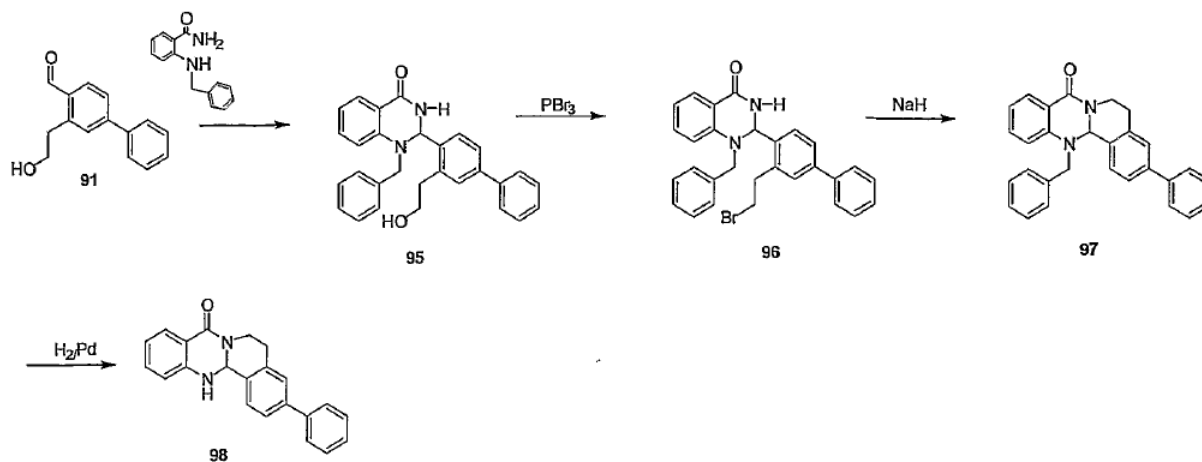
El isótero de carbono de SC-2-71 se sintetizará a través de una estrategia de condensación de imina (esquema 9). Esto implicará la formación de la imina apropiada 83. La adición de 83 a la N,N-diethyl-2-metilbenzamida 83 dará la amida protegida con PMB 84. La desprotección con CAN (nitrato de amonio cérico) acuoso proporcionará el producto final 85. Este compuesto se usará en la elucidación adicional de la importancia del nitrógeno de amina en la interacción de NH-tirosina 36 propuesta.

Esquema 10. Síntesis de análogos rígidos (amina)



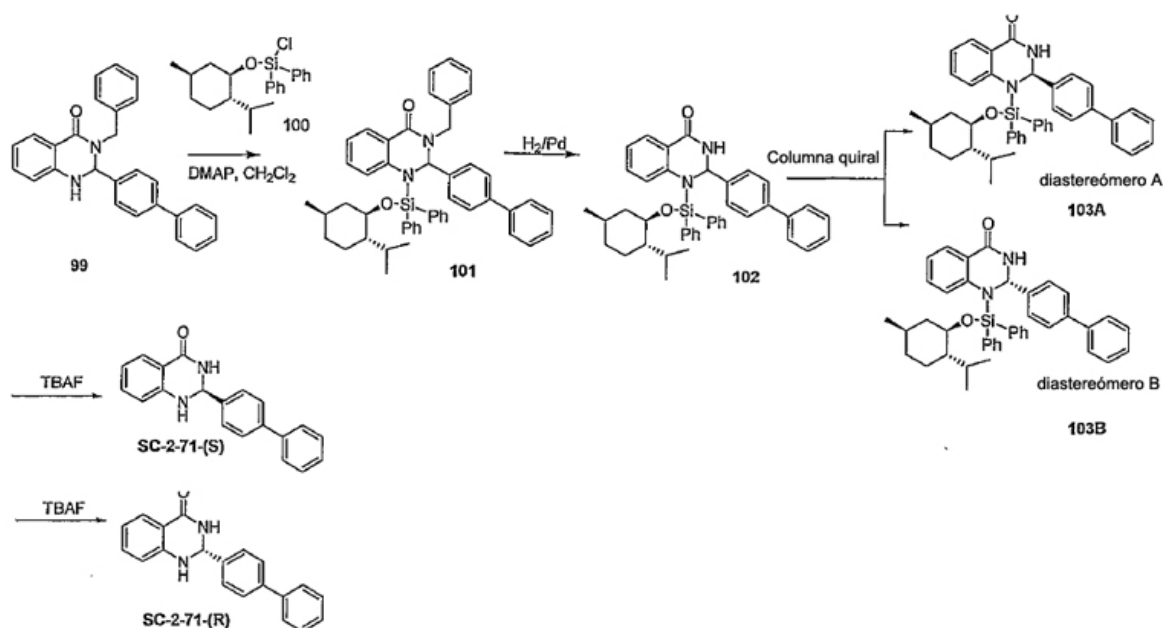
Para sintetizar el análogo rígido 94 (esquema 10), se logrará la adición de un grupo alílico a 86 mediante una reacción de acoplamiento de paladio. El fenol sustituido 87 se triflará y luego se preparará el bifenilo 89 para un acoplamiento de Suzuki convencional. La adición de MCPBA dará el epóxido 90. Esto abrirá el anillo para generar el alcohol 91. La condensación de 91 con antranilimida proporcionará 92. La bromación del alcohol con PBr_3 generará 93. La ciclación de 93 proporcionará el producto final 94.

Esquema 11. Síntesis de análogos rígidos (amida).



El análogo rígido unido a amida 91 se sintetizará por condensación de N-bencilantranilimida con 91 (esquema 11). La conversión del alcohol en el derivado de bromo 96 y luego la ciclación del anillo proporcionará 97. Se obtendrá el producto final 98 mediante desprotección fácil de 97.

Esquema 12. Resolución quiral de SC-2-71



La evaluación de las acciones enantioselectivas de SC-2-71 es muy importante en la comprensión de la interacción molecular con β -tubulina y los efectos sobre el crecimiento celular. Se ha diseñado un esquema sencillo para resolver los enantiómeros de SC-2-71 (esquema 12). Usando bencilo protegido 99, se añadirá el siloxano quiral 100 para generar 101. La desprotección de 101 y la resolución de 102 sobre una columna quiral generará dos diastereómeros separados A y B. El agente de derivatización quiral se escindirá usando TBAF para proporcionar cada enantiómero (esquema 12).

Un experto en la técnica apreciará que la superioridad de las composiciones y los métodos de la invención en relación con las composiciones y los métodos de la técnica anterior no están relacionados con la precisión fisiológica de la teoría que explica los resultados superiores.

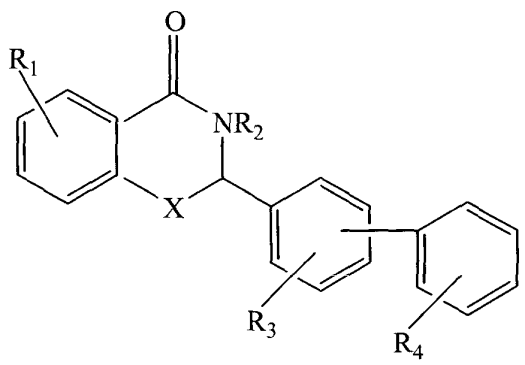
Se incluyen encabezamientos en el presente documento para referencia y para ayudar en la localización de determinadas secciones. Estos encabezamientos no pretenden limitar el alcance de los conceptos descritos a continuación de los mismos, y estos conceptos pueden aplicarse en otras secciones en toda la memoria descriptiva.

Otros métodos que se usarán pero no se describirán en el presente documento se conocen bien y están dentro de la competencia de un experto habitual en la técnica de biología clínica, química, celular, histoquímica, bioquímica, molecular, microbiología y técnicas de ADN recombinante.

La descripción de las realizaciones dadas a conocer se proporciona para permitir a cualquier experto en la técnica realizar o usar la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que tiene la estructura general de:

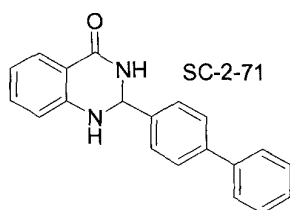


en la que R₁, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, halo y alquilo C₁-C₄;

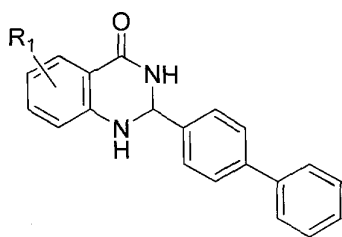
X es NR₅; y

R₂ y R₅ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, halo, arilo C₅-C₆, alquilo C₁-C₄, alquenilo C₁-C₄ y alquinilo C₁-C₄.

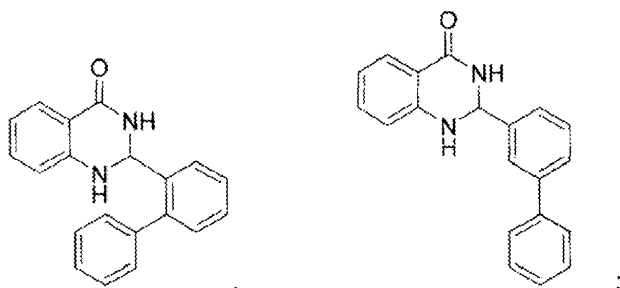
2. Compuesto según la reivindicación 1, que es

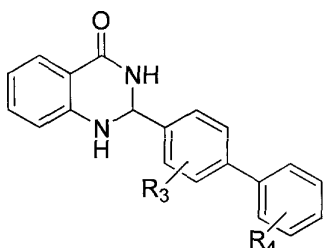
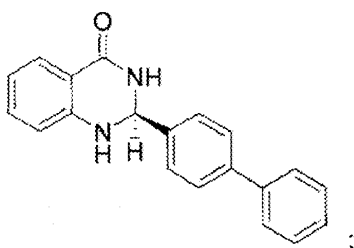


3. Compuesto seleccionado del grupo que consiste en

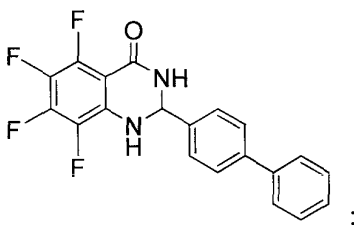


en la que R₁ es 2-Cl, 2-CH₃, 3-Cl, 3-CH₃, 4-Cl o 4-CH₃;

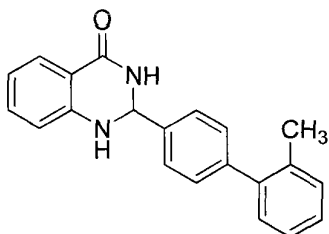




en la que R₃ es 2-Cl y R₄ es H, R₃ es 3-Cl y R₄ es H, R₃ es 2-CH₃ y R₄ es H, R₃ es 3-CH₃ y R₄ es H, R₃ es H y R₄ es 2,3,4-tricloro, o R₃ es H y R₄ es 2,3,4-trimetilo;

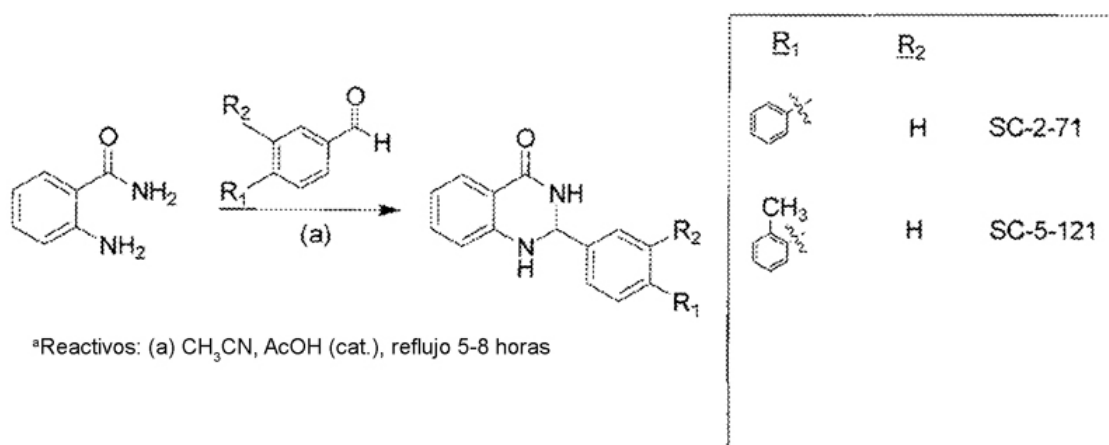


y



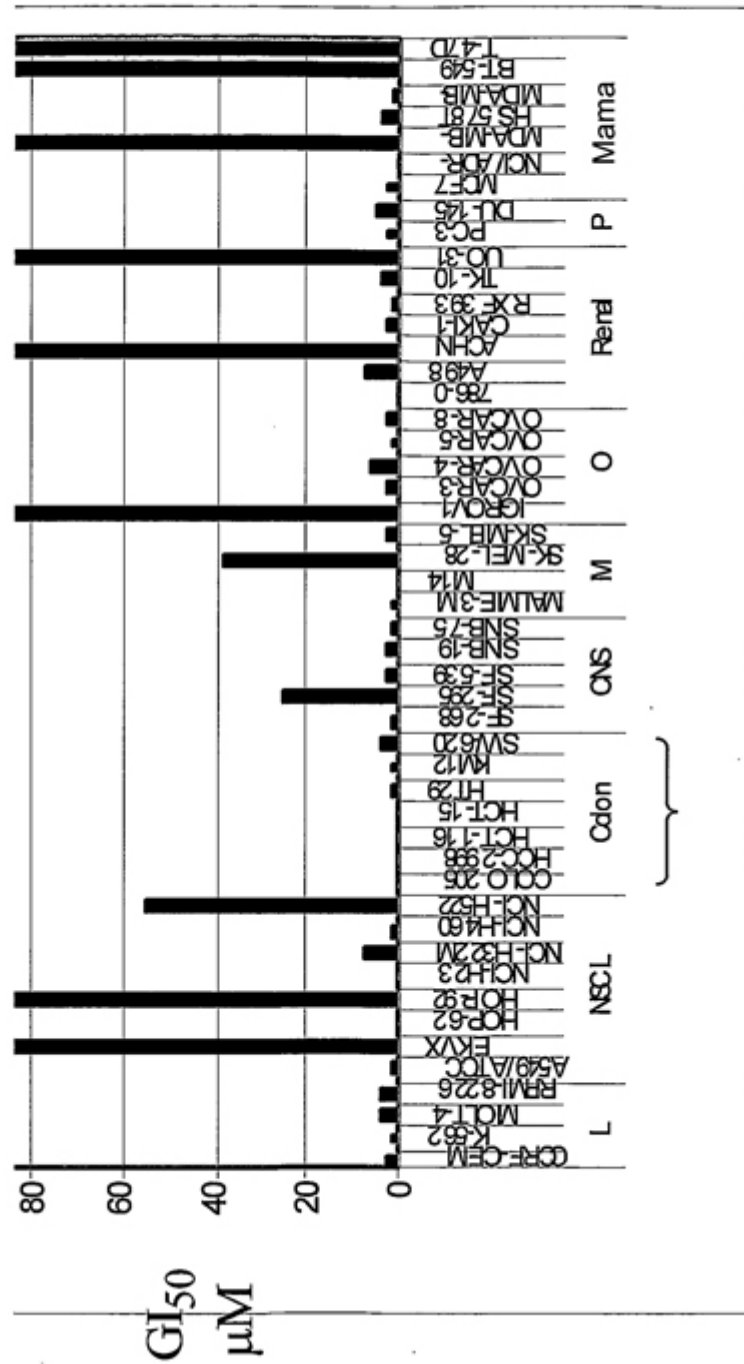
4. Composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso como medicamento.
6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso como medicamento para tratar cáncer en un sujeto.
7. Compuesto para su uso según la reivindicación 6, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, melanoma, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer renal, del sistema nervioso central, leucemia, carcinoma de células no pequeñas y cáncer de pulmón.
8. Compuesto para su uso según la reivindicación 6 ó 7, en el que dicho sujeto es un ser humano.
9. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicho cáncer comprende una proteína p53 mutante.
10. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que dicho medicamento es para administrarse a través de una vía seleccionada del grupo que consiste en tópica, oral, bucal, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, sublingual, vaginal, oftálmica, pulmonar y rectal.

11. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que dicho medicamento comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterápico conocido.
12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso como medicamento para tratar una enfermedad o trastorno asociado con angiogénesis en un sujeto.
13. Compuesto para su uso según la reivindicación 12, en el que dicha enfermedad o trastorno relacionado con angiogénesis se selecciona del grupo que consiste en cáncer, artritis reumatoide, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolenticular, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de vitamina A, uso excesivo de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, pterigión, queratoconjuntivitis seca, síndrome de Sjögren, acné rosácea, filectenulosis, sífilis, infecciones por micobacterias, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por herpes simple, infecciones por herpes zóster, infecciones protozoarias, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratólisis marginal, traumatismo, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, sarcoidosis de Wegener, escleritis, enfermedad de Stevens-Johnson, penfigoide, queratotomía radial, rechazo de injerto de córnea, degeneración macular, anemia drepanocítica, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástico, enfermedad de Paget, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva carotídea, uveítis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía del prematuro, enfermedad de Eales, enfermedad de Behcet, infecciones que producen una retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, enfermedad de Best, miopía, foveas papilares, enfermedad de Stargart, pars planitis, desprendimiento de retina crónico, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismo y complicaciones tras láser.
14. Compuesto para su uso según la reivindicación 12 ó 13, en el que dicho sujeto es un ser humano.
15. Método de inhibición de la proliferación de células endoteliales vasculares, comprendiendo dicho método poner en contacto dichas células con una cantidad eficaz de una composición farmacéutica según la reivindicación 4, pero excluyendo un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
16. Método según la reivindicación 15, en el que dicha célula endotelial se selecciona del grupo que consiste en células endoteliales de microvasos, células endoteliales arteriales y células endoteliales venosas.
17. Método según la reivindicación 15 ó 16, en el que dicha célula endotelial es una célula endotelial humana.
18. Método de inhibición de la proliferación de células cancerosas, comprendiendo dicho método poner en contacto dichas células con una cantidad eficaz de composición farmacéutica según la reivindicación 4, pero excluyendo un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
19. Método de preparación del compuesto SC-2-71 o SC-5-121, comprendiendo dicho método la ruta de síntesis del esquema 1:



20. Kit para administrar una composición farmacéutica a un sujeto para tratar cáncer o una enfermedad o trastorno asociado con angiogénesis, comprendiendo dicho kit una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un aplicador y un material de instrucciones para el uso del mismo.

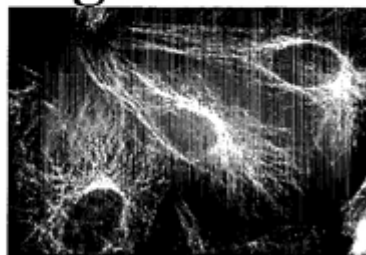
Fig. 1



Datos de GI₅₀
en la tabla 2

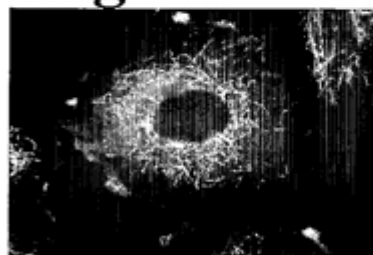
Líneas celulares

Fig. 2A



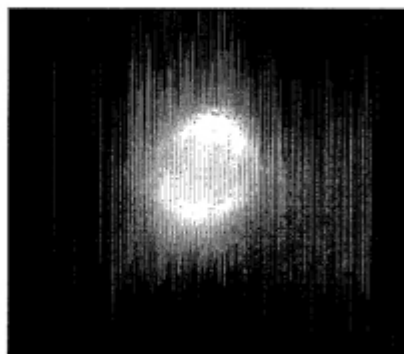
Control

Fig. 2B



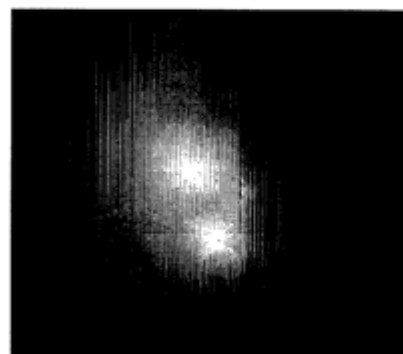
SC-2-71 33 μ M

Fig. 3A

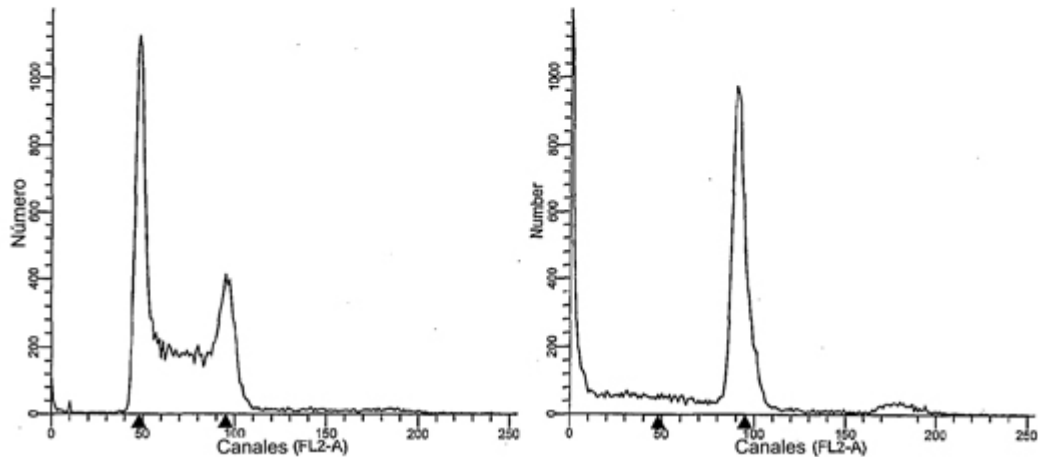


Control

Fig. 3B



SC-2-71 1,65 μ M

Fig. 4.**Fig. 5.**

III	MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPSGNYVGDSDLQLERISVYYNEASSHKYV	60
cristal	MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGDSDLQLERINVYYNEAAGNKYV	60
III	PRAILVDLEPGTMDSVRSGAFGHLFRPDNFIPGQSGACNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVV	120
cristal	PRAILVDLEPGTMDSVRSGPFQIFRPFNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVV	120
III	RKECENCDCLQGFLTHSLGGGTGSGMGTLLISKVREYFPRIMNTFSVVPSPKVSDTVV	180
cristal	RKESCDCLQGFLTHSLGGGTGSGMGTLLISKIREYFPRIMNTFSVVPSPKVSDTVV	180
III	EPYNATLSIHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLATPTYGDLNHLVSATMSGVTTSI	240
cristal	EPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLITPTYGDLNHLVSATMSGVTTCI	240
III	RFGQLNADLRKLAVNMVFFPRLHFFMPGFAPLTRRGSQQYRALTVPELTQQMFDKNNM	300
cristal	RFPQQLNADLRKLAVNMVFFPRLHFFMPGFAPLTRRGSQQYRALTVPELTQQMFDKNNM	300
III	AACDPRHGRYLTVAIVFRGRMSMKEVDEQMLAIQSKNSSYFVEWIPNNVKVAVCDIPPRG	360
cristal	AACDPRHGRYLTVAIVFRGRMSMKEVDEQMLNVQKNSSYFVEWIPNNVKVAVCDIPPRG	360
III	LQMSSTFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFHLWYTGEQMDMEFTEAESNMNDLVS	420
cristal	LQMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFHLWYTGEQMDMEFTEAESNMNDLVS	420
III	EYQQYQDA---TAEEGEMYEDDEESEAQQPK-----	450
cristal	EYQQYQD-----	427

Fig. 6A

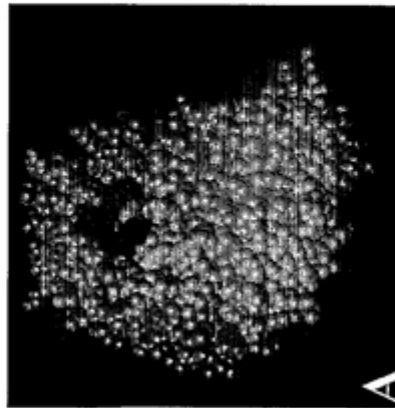


Fig. 6B

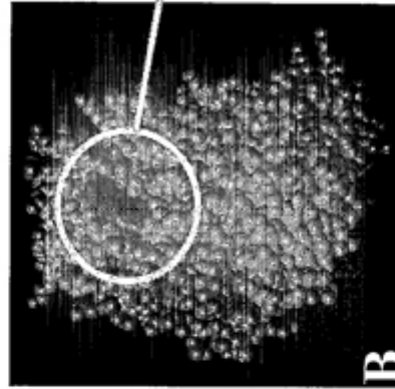
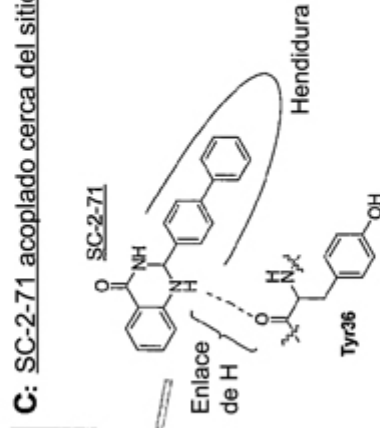


Fig. 6C



- (A) Taxol (azul) cocrystalizado en β -tubulina
- (B) SC-2-71 (rojo) acoplado en β -tubulina
- (C) SC-2-71 forma un enlace de hidrógeno con Tyr36

Fig. 7.

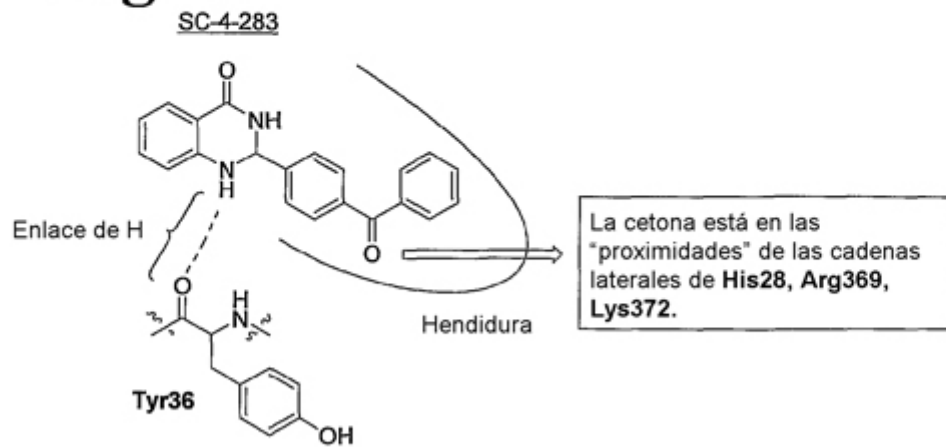


Fig. 8A

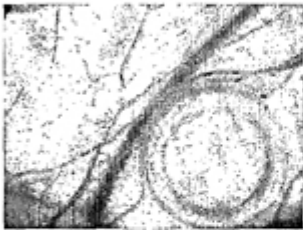


Fig. 8B

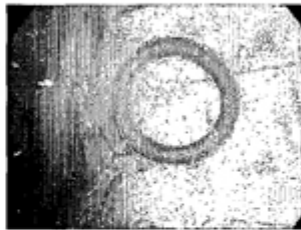


Fig. 8C

