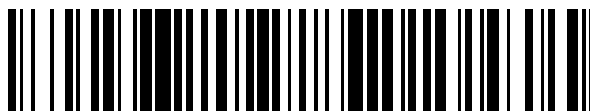


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 099**

51 Int. Cl.:

A61K 31/277	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
A61P 1/16	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61P 3/04	(2006.01) A61P 37/06	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01)	
A61P 7/00	(2006.01)	
A61P 7/06	(2006.01)	
A61P 13/12	(2006.01)	
A61P 19/02	(2006.01)	
A61P 25/16	(2006.01)	
A61P 25/28	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2013 PCT/AU2013/000859**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14022879**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2013 E 13827913 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2880014**

54 Título: **Compuestos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la vía de mTOR**

30 Prioridad:

06.08.2012 AU 2012903365

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

26.07.2017

73 Titular/es:

**PITNEY PHARMACEUTICALS PTY LIMITED
(100.0%)
Level 3 Pitney Building St George Hospital Gray
Street
Kogarah, NSW 2217, AU**

72 Inventor/es:

**POURGHOLAMI, MOHAMMAD HOSSEIN;
MORRIS, DAVID L. y
ASTON, ROGER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 627 099 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la vía de mTOR

5 Campo técnico

En general, la presente invención se refiere a compuestos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la vía de mTOR (diana de Rapamicina en células de mamíferos). Específicamente, la presente invención se refiere al uso de derivados de aminoacetonitrilo (AAD) en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la vía de mTOR.

10

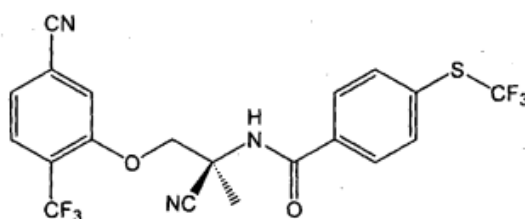
Antecedentes

Los derivados de aminoacetonitrilo (AAD) son una clase de antihelmínticos eficaces contra los nemátodos resistentes a fármacos. Los nemátodos, o lombrices, comprenden un gran número de patógenos del hombre y de los animales domésticos. Los nemátodos gastrointestinales, como *Haemonchus contortus*, son parásitos importantes de los rumiantes que causan pérdidas económicas sustanciales a la producción ganadera en todo el mundo.

15

El monepantel (MPL) (N-[(1S)-1-Ciano-2-(5-ciano-2-trifluorometil-fenoxi)-1-metil-etil]-4-trifluorometilsulfanil-benzamida) es un ejemplo de tal AAD y se aprobó como nematocida para el tratamiento de parásitos gastrointestinales de ovejas.

20



25

MPL

30

Se demostró que MPL es eficaz contra diversas especies de nemátodos patógenos para el ganado.

Como un nematocida, el mecanismo de acción de MPL es a través de los canales iónicos que se abren por el ligando lo que conducen a la interferencia de la transducción de la señal en la sinapsis neuromuscular. Los parásitos afectados experimentarán disregulación en la contracción muscular, parálisis, necrosis y defectos de muda. Se han identificado tres genes relacionados con el receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) como las dianas primarias de MPL y los tres genes codifican para las proteínas que representan la subfamilia DEG-3 de las subunidades nAChR que sólo se presentan en nemátodos. El gen DEG-3 codifica una subunidad α de nAChR que tiene semejanza con aquella de la subunidad $\alpha 7$ en el segundo dominio transmembrana.

40

Ahora se encontró, sorprendentemente, que los AAD, además, se unen a la diana de la vía mTOR (receptores) en células de mamíferos y como tales son eficaces en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la vía de mTOR. Los derivados de aminoacetonitrilo que muestran una alta actividad antihelmíntica contra nemátodos parasitarios se describen por Ducray, P. y otros, en "Discovery of Amino-acetonitrile Derivatives, A new Class of Synthetic Anthelmintic Compounds", Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2008, 18, 2935-2938. El documento W02013/138863 se refiere al uso de inhibidores especificados de quinasas en el tratamiento del cáncer, y específicamente al uso de los derivados de aminoacetonitrilo (AAD) en el tratamiento del cáncer.

45

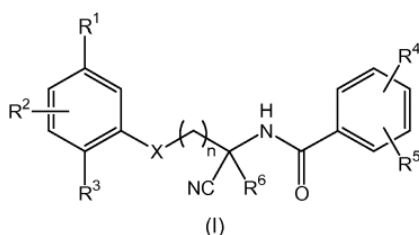
Tsang, C. y otros, en "Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases", Drug Discovery Today, 2007, 12, no. 3-4, 112-124, describe la vía de mTOR, y describe las enfermedades relacionadas a la disregulación de este, así como también los compuestos que actúan como inhibidores de mTOR.

50

Resumen de la invención

55

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula (I):



60

65

o una sal aceptable farmacéuticamente, o solvato de este, para usar en el tratamiento de una o más enfermedades relacionadas con la vía de mTOR, en donde la una, o más enfermedades relacionadas con la vía de mTOR se seleccionan de enfermedades neurodegenerativas, enfermedades relacionadas con la edad, enfermedades relacionadas con el rechazo de trasplante, enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades relacionadas con el almacenamiento de glucógeno, lupus sistémico, enfermedades relacionadas con la inflamación y la activación inmune, anemia, leucopenia, trombocitopenia, enfermedades relacionadas con el recubrimiento de endoprótesis, insuficiencia renal, obesidad, diabetes/resistencia a la insulina, enfermedades relacionadas con el hígado graso no alcohólico, riñón poliquístico, y fibrosis y en donde,

R¹ es -CN;

R² y R³ y R⁵ cada uno se selecciona independientemente de H, alquilo, halógeno, -CF₃ o -CN;

R⁴ y R⁶ cada uno se selecciona independientemente de H, alquilo, halógeno, alcoxi, -CF₃, -OCF₃, -SO₂CF₃, -SOCF₃ o -SCF₃;

X es un heteroátomo, N(alquilo) o NH; y

n es 1 a 20.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un medio para tratar una o más enfermedades relacionadas con la vía de mTOR, en donde la una, o más enfermedades relacionadas con la vía de mTOR se seleccionan a partir de enfermedades neurodegenerativas, enfermedades asociadas a la edad, enfermedades relacionadas al rechazo de trasplante, enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades relacionadas con el almacenamiento de glucógeno, lupus sistémico, enfermedades relacionadas a la inflamación y la activación inmune, anemia, leucopenia, trombocitopenia, enfermedades relacionadas con el recubrimiento de endoprótesis, insuficiencia renal, obesidad, diabetes/resistencia a la insulina, enfermedades relacionadas con hígado graso no alcohólico, riñón poliquístico, y fibrosis y el medio comprende administrar una cantidad con eficacia terapéutica de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente, o solvato de este, a un paciente que lo necesite.

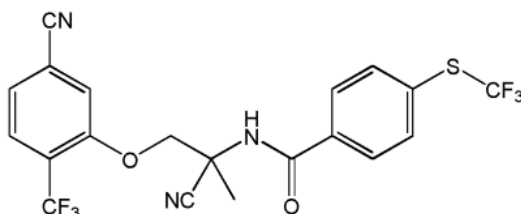
De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I), o una sal aceptable farmacéuticamente, o solvato de este, de acuerdo al primer aspecto de la invención, para usar en el tratamiento de una o más enfermedades relacionadas con la vía de mTOR, en donde la una, o más enfermedades relacionadas con la vía de mTOR se seleccionan a partir de enfermedades neurodegenerativas, enfermedades asociadas con la edad, enfermedades relacionadas al rechazo de trasplante, enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades relacionadas con el almacenamiento de glucógeno, lupus sistémico, enfermedades relacionadas a la inflamación y la activación inmune, anemia, leucopenia, trombocitopenia, enfermedades relacionadas con el recubrimiento de endoprótesis, insuficiencia renal, obesidad, diabetes/resistencia a la insulina, enfermedades relacionadas con hígado graso no alcohólico, riñón poliquístico, y fibrosis.

R¹ es -CN. Preferentemente, R² es H o halógeno, y con mayor preferencia H. Preferentemente, R³ es -CF₃ o halógeno y con mayor preferencia -CF₃. Preferentemente, R⁴ es -SCF₃, -SOCF₃, -SO₂CF₃, -OCF₃ o -CF₃. Con mayor preferencia, R⁴ es -SCF₃ o -SO₂CF₃. Preferentemente, R⁵ es H.

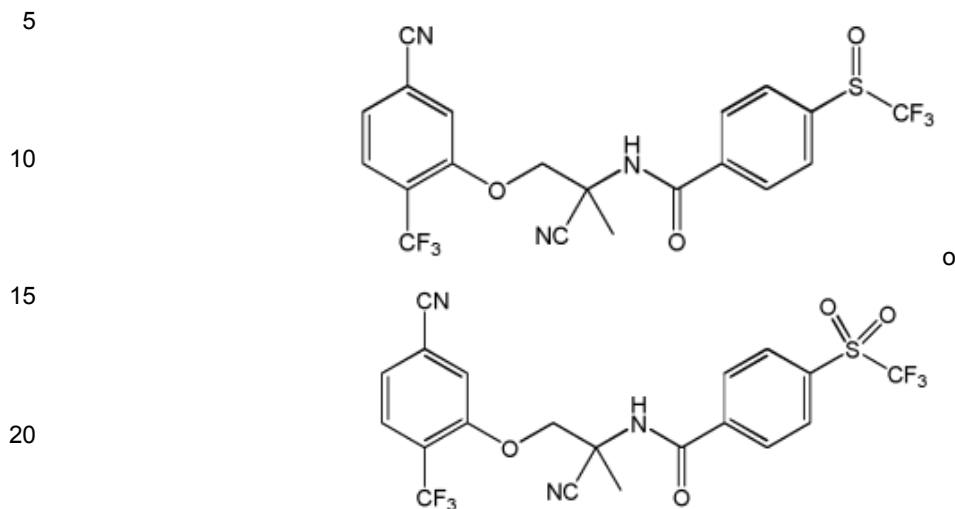
Preferentemente, R⁶ es alquilo y con mayor preferencia CH₃. Preferentemente, X es O. Preferentemente, n es 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 2, o 1. Con la máxima preferencia, n es 1. Preferentemente, R⁴ se dispone para respecto a la mitad amida.

El compuesto de fórmula (I) puede ser el enantiómero (R) o (S), o el racemato. Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) es el enantiómero (S).

Los compuestos de la fórmula I pueden seleccionarse a partir de cualquiera de los siguientes compuestos:

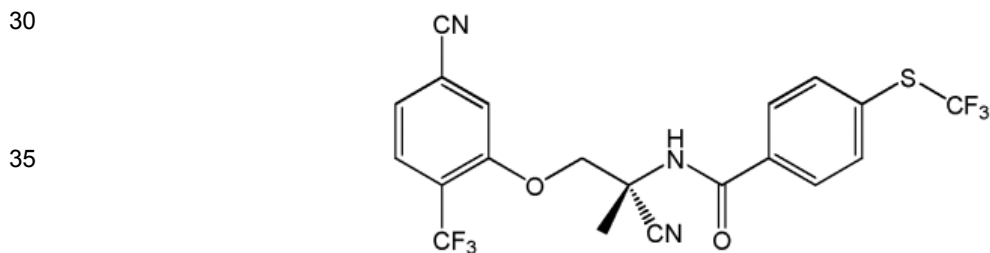


;



25 en donde cada uno de los compuestos anteriores es el enantiómero (R) o (S), o el racemato, o una sal aceptable farmacéuticamente o solvato de este.

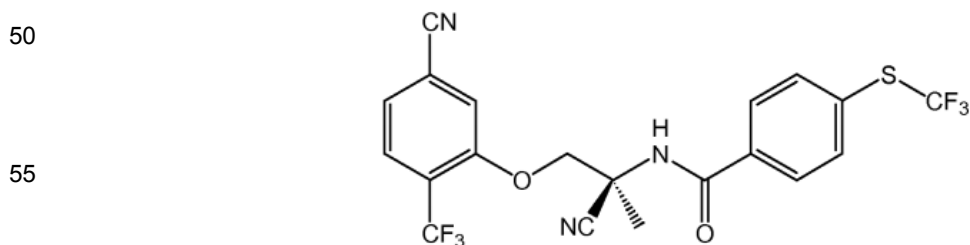
Preferentemente el compuesto de fórmula (I) puede ser el siguiente compuesto:



AAD 2224 (MPL-(R)).

45 en donde el compuesto anterior es el enantiómero (R) o (S), o el racemato, (de no ser especificado) o una sal aceptable farmacéuticamente, o solvato de este.

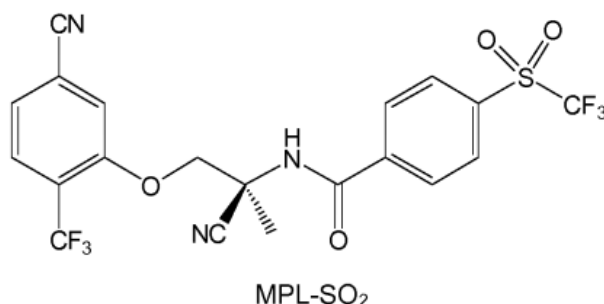
Con mayor preferencia, el compuesto de fórmula (I) es MPL (N-[(1S)-1-ciano-2-(5-ciano-2-trifluorometil-fenoxi)-1-metil-etil]-4-trifluorometilsulfanil-benzamida):



MPL

o una sal aceptable farmacéuticamente, o solvato de este.

65 Además, el compuesto de la invención puede ser un metabolito de MPL, que es monepantel sulfona (MPL-SO₂):



o una sal aceptable farmacéuticamente, o solvato de este.

Preferentemente la una, o más enfermedades relacionadas con la vía de mTOR se seleccionan a partir de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedades asociadas con la edad, enfermedades relacionadas al rechazo de trasplante, enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades relacionadas con el almacenamiento de glucógeno, lupus sistémico, enfermedades relacionadas a la inflamación y la activación inmune, anemia, leucopenia, trombocitopenia, enfermedades relacionadas con el recubrimiento de endoprótesis, insuficiencia renal, obesidad, diabetes/resistencia a la insulina, enfermedades relacionadas con hígado graso no alcohólico, riñón poliquístico, enfermedad de Parkinson y fibrosis.

Preferentemente, la fibrosis es fibrosis del hígado, fibrosis cardíaca o fibrosis pulmonar.

Preferentemente, la enfermedad relacionada con la vía de mTOR es una enfermedad inflamatoria crónica, que puede ser la artritis reumatoide o el rechazo de un órgano después del trasplante.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la inhibición de la proliferación celular por MPL. Las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3, A2780 y SKOV-3 y la línea celular normal HUVEC (control) se cultivaron todas en presencia de MPL (0, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{mol/L}$) durante 72 horas. El efecto de MPL sobre la proliferación celular se evaluó mediante el uso del ensayo SRB. Las células control (tratadas con vehículo) se tomaron para presentar el 100 % de proliferación y los grupos tratados con MPL se expresaron como el porcentaje del control. Cada concentración del fármaco se evaluó por cuadruplicado y cada experimento se repitió al menos dos veces. Los datos (media $\pm$ SEM) se presentan como el porcentaje del control. Para las comparaciones estadísticas, cada grupo tratado con el fármaco se comparó con el grupo control mediante el uso de la prueba t de Student.

La Figura 2 muestra el efecto de MPL sobre la actividad formadora de colonias de las células OVCAR-3. Después de la incubación de las células con MPL (0, 5, 10 y 25 $\mu\text{mol/L}$) durante 72 horas, las células se lavaron, y se transfirieron a placas de agar, se cultivaron con su medio de crecimiento habitual y se incubaron bajo condiciones estándar durante 2 semanas. Después las células se fijaron con metanol 100 % y se tiñeron con violeta cristal al 1 %. Las colonias (conglomerados celulares mayores de 50 células) se contaron bajo un microscopio (aumento 5x). El número de colonias contadas para los grupos experimentales diferentes se expresó como un porcentaje del control.

La Figura 3 muestra como interfiere MPL con la distribución del ciclo celular de las líneas celulares de cáncer de ovario. Las células OVCAR-3 (Figura 3a) o A2780 (Figura 3b) se trataron con MPL (0, 5, 10 y 25 $\mu\text{mol/L}$) durante 48 horas. Las células teñidas con ioduro de Propodio se analizaron en cuanto al contenido de DNA mediante el uso del análisis por citometría de flujo. Los resultados (ver tabla) se muestran como un porcentaje de las células en las fases G1, S y G2/M. Cada valor representa la media $\pm$ SEM de 2 experimentos independientes.

La Figura 4 muestra que MPL interfiere con la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular cdk2, cdk4 y las ciclinas E y A. Las células se trataron con MPL (0, 5, 10 y 25 $\mu\text{mol/L}$) durante 48 horas. Los extractos de proteínas totales se obtuvieron y separaron mediante electroforesis y las inmunoelectrotransferencias se trataron con los anticuerpos indicados. El análisis de la inmunoelectrotransferencia por Western que muestra los niveles de estas proteínas en cada extracto se analizó mediante el uso de los anticuerpos adecuados. La imagen representa la película radiográfica expuesta y escaneada. Se usó el gen de expresión constitutiva (GAPDH) para confirmar que se cargaron y se electrotransfirieron niveles similares de proteína.

La Figura 5 muestra un análisis de inmunoelectrotransferencia de PARP y de PARP escindido en células tratadas con MPL. Las células OVCAR-3 y A2780 crecidas bajo las condiciones de cultivos celulares, se incubaron con diversas concentraciones de MPL [0, 5, 10, 25 μM] durante 24, 48 o 72 horas. Después, se prepararon extractos celulares y se analizaron mediante inmunoelectrotransferencia por Western para la determinación de PARP y de PARP escindido.

La Figura 6 muestra que el tratamiento de las células de cáncer de ovario A2780 con MPL o las células de glioma U87 con MPL-SO2 conduce a la formación de vacuolas lo que sugiere que MPL y MPL-SO2 inducen autofagia en estas células. La autofagia es una característica de la inhibición de mTOR.

- 5 La Figura 7, consistente con lo que se muestra en la Figura 6, muestra que el tratamiento con MPL reduce la relación celular de ADP/ATP, lo que es otro indicador de autofagia celular.

10 La Figura 8 muestra el efecto de MPL sobre el ATP y la relación ADP/ATP en la línea celular de cáncer de ovario OVCAR-3. La exposición de las células a MPL bajo condiciones estándar de cultivo de células conduce a una reducción de los niveles de ATP y, consecuentemente, a un aumento de la relación ADP/ATP. Los niveles de ADP y ATP se midieron en el medio mediante el uso de los estuches comerciales de ensayo colorimétrico/fluorométrico de Abeam junto con el estuche de ensayo ApoGlow de Lonza (Sucursal de Australia, Sídney). Cada valor representa la media + S.E.M. de al menos dos determinaciones.

15 La Figura 9 muestra la interferencia de MPL con la viabilidad celular. A) Imagen microscópica de las células OVCAR-3 expuestas a MPL (0, 5, 10, 25 μ M) durante 72 horas. Las líneas celulares de cáncer de ovario humano OVCAR-3, A2780, SKOV-3, IGROV-1 se cultivaron en presencia de MPL (0, 5, 25, μ mol/L) durante 72 horas. El efecto de MPL sobre la viabilidad celular se evaluó mediante el uso del ensayo estándar de azul de Tripán. Se tomaron células control (tratadas con vehículo) para presentar el 100 % de viabilidad y los grupos tratados con MPL se expresaron como porcentaje del control. Cada concentración del fármaco se evaluó en cuadruplicado y cada experimento se repitió al menos dos veces. Los datos (media $\pm$ SEM) se presentan como el % del control. Para las comparaciones estadísticas, se comparó cada grupo tratado con el fármaco con el grupo de control mediante el uso de la prueba t de Student y se consideró que un valor de p de 0.5 o menos presenta un cambio significativo ($p < 0.05$), * $= < 0.05$, ** < 0.01 , *** $= p < 0.001$.

25 La Figura 10 muestra el efecto de MPL sobre la viabilidad de células normales y muestra que el efecto antiproliferativo se orienta a las células cancerígenas. Las células normales HOSE, CHO, HEK y HUVEC se cultivaron en la presencia de MPL (0, 5, 10, 25, μ mol/L) durante 72 horas. El efecto de MPL sobre la viabilidad celular se evaluó mediante el uso del ensayo estándar de azul de Tripán. Los resultados se presentan como la media $\pm$ SEM en comparación con el control (100 %).

30 La Figura 11 muestra como MPL inhibe la proliferación celular. Las líneas celulares de cáncer de ovario humano OVCAR-3, A2780 y SKOV-3 e IGROV-1 se cultivaron todas en presencia de MPL (0, 5, 10, 25, 50 y 100 μ mol/L) durante 72 horas. El efecto de MPL sobre la proliferación celular se evaluó mediante el uso del ensayo SRB. Las células control (tratadas con vehículo) se tomaron para presentar el 100 % de proliferación y los grupos tratados con MPL se expresaron como el porcentaje del control. Cada concentración de fármaco se evaluó en cuadruplicado y cada experimento se repitió al menos dos veces. Los datos (media $\pm$ SEM) se presentan como el % del control. Para las comparaciones estadísticas, cada grupo tratado con el fármaco se comparó con el grupo control mediante el uso de la prueba t de Student. (A): Atropina: antagonista del receptor muscarínico Ach., Tobucorarina: antagonista del receptor nicotínico Ach., Mecamilamina: antagonista no selectivo, no competitivo del receptor nicotínico; (B): Carbacol: agonista del receptor muscarínico nicotínico ach., Nicotina: agonista del receptor nicotínico, Alfa-bungarotoxina: agonista selectivo $\alpha 7$ del receptor nicotínico ach.

45 La Figura 12 muestra que el efecto antiproliferativo de MPL es independiente de los receptores nicotínicos. Las células se pretrataron (30 minutos) con concentraciones crecientes de nicotina, carbacol o los antagonistas del receptor, atropina, mecamilamina, tubocurarina y α -bungarotoxina. Se añadió MPL (5 μ M) y se dejó en la incubadora de cultivo celular durante 72 horas. Cada concentración del fármaco se ensayó en cuadruplicado y cada experimento se repitió dos veces. Los valores de las combinaciones (media $\pm$ SEM) se presentan como el % de control.

50 La Figura 13 muestra como MPL inhibe la proliferación de células de glioma. Comparación del efecto del tratamiento con MPL (0, 5, 10, 25, 50 μ M; 72 horas) sobre la proliferación de las líneas celulares de glioma U87-MG, U251 con respecto a astrocitos normales bajo condiciones normales de cultivo celular y mediante el uso del ensayo de proliferación SRB. Los datos se presentan como el % del control.

55 La Figura 14 muestra como MPL induce autofagia. El tratamiento de las células de glioma U87, resistentes a quimioterapia, con MPL conduce a la autofagia, lo que se confirma por el aumento de la expresión de LC3-II en una manera dependiente de la concentración. Las células de glioma U87-MG y U251 tratadas con MPL demostraron la formación de autofagia dependiente de la concentración (se muestra como vacuolas). La conversión de LC3-I a LC3-II, dependiente de la concentración, confirma el fenómeno creciente de la autofagia en estas células.

60 La Figura 15 muestra el efecto de MPL sobre la actividad de formación de colonias de las células OVCAR-3 y A2780. Después de la incubación de las células con MPL (0, 5, 10, 25 μ M) durante 72 horas, las células se lavaron y después se transfirieron a placas de agar, se cultivaron con su medio de crecimiento habitual y se incubaron en condiciones estándar durante 2 semanas. Después, las células se fijaron con metanol al 100 % y se tiñeron con violeta cristal al 1 %. Las colonias (conglomerados celulares mayores de 50 células) se contaron bajo un microscopio (aumento 5x). El número de colonias contadas para los grupos experimentales diferentes se expresó como % del control.

La Figura 16 muestra como MPL interfiere con la progresión del ciclo celular de las líneas celulares de cáncer de ovario. Las células OVCAR-3 o A2780 se trataron con MPL (0, 5, 10, 25 μ M) durante 48 horas y se examinaron mediante el análisis de citometría de flujo (FACS) después de teñir las células con PI. La Figura y los datos presentan los cambios que induce MPL en la distribución de las células en diversas fases del ciclo celular, mostradas aquí como el porcentaje de células en las fases G1, S y G2/M. Cada valor representa la media $\pm$ SEM de 2 determinaciones independientes.

La Figura 17 muestra como MPL interfiere con la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular cdk2, cdk4, ciclinas E y A. Las células se trataron con MPL (0, 5, 10, 25 μ M) durante 24, 48 horas o 72 horas. Se obtuvieron extractos de proteínas totales y se separaron por electroforesis, y las inmunoelectrotransferencias se trataron con los anticuerpos indicados. El análisis de la inmunoelectrotransferencia por Western que muestra los niveles de estas proteínas en cada extracto se analizó mediante el uso de los anticuerpos adecuados. La imagen representa la película radiográfica expuesta y escaneada. Se usó el gen de expresión constitutiva (GAPDH) para confirmar que se cargaron y se electrotransferieron niveles similares de proteína.

La Figura 18 muestra como MPL escinde PARP. La exposición de las células OVCAR-3 o A2780 a MPL (0, 5, 10, 25 μ M) durante 24, 48 o 72 horas produce la escisión de PARP, lo que conduce al desensamblaje celular y sirve como un marcador de células moribundas.

Las Figuras 19A y 19B muestran como MPL disminuye los niveles de ATP. La exposición de las células OVCAR-3 o A2780 a MPL (0, 5, 10, 25 μ M) durante 24, 48 o 72 horas produce la escisión de PARP, lo que conduce al desensamblaje celular y sirve como un marcador de células moribundas.

La Figura 20 muestra el efecto del monepantel administrado i.p. (intraperitoneal) sobre el crecimiento tumoral s.c. (subcutáneo) en ratones desnudos. 2.5 millones de células OVCAR-3, en fase logarítmica de crecimiento, se inyectaron por vía s.c. en el flanco izquierdo de cada ratón. El crecimiento tumoral se monitoreó mediante las mediciones con un pie de rey y los volúmenes tumorales se determinaron a través de la medición de los diámetros ortogonales. El volumen estimado del tumor se calculó en base a la fórmula $1/2$ (LargoxAncho²), donde el ancho es la más corta de las dos mediciones ortogonales. El tratamiento se inició 7 días después de la inyección de las células tumorales antes de lo cual, los ratones se aleatorizaron y se asignaron al grupo de tratamiento o al grupo control (6 por grupo). El Monepantel suspendido en HPMC 0.5 % se administró por vía i.p. a 2.5 o 25 mg/kg tres veces por semana. El grupo control se trató únicamente con el vehículo.

La Figura 21 muestra el efecto del monepantel administrado por vía i.p. sobre el crecimiento tumoral s.c. en los ratones desnudos. Las células OVCAR-3, en fase logarítmica de crecimiento, se inyectaron por vía s.c. en el flanco izquierdo de cada ratón. El crecimiento tumoral se monitoreó mediante las mediciones con un pie de rey y los volúmenes tumorales se determinaron a través de la medición de los diámetros ortogonales. El volumen estimado del tumor se calculó en base a la fórmula $1/2$ (LargoxAncho²), donde el ancho es la más corta de las dos mediciones ortogonales. El tratamiento se inició 7 días después de la inyección de las células tumorales antes de lo cual, los ratones se aleatorizaron y se asignaron al grupo de tratamiento o al grupo control (6 por grupo). El Monepantel suspendido en HPMC 0.5 % se administró por vía i.p. a 25 o 50 mg/kg tres veces por semana. El grupo control se trató únicamente con el vehículo.

La Figura 22 muestra el efecto del monepantel por vía oral sobre el crecimiento tumoral en ratones desnudos. Las células OVCAR-3 se inyectaron por vía s.c. en el flanco izquierdo de cada ratón. El crecimiento tumoral se monitoreó mediante las mediciones con un pie de rey y los volúmenes tumorales se determinaron por los diámetros ortogonales, y el volumen estimado del tumor se calculó en base a la fórmula $1/2$ (LargoxAncho²), donde el ancho es la más corta de las dos mediciones ortogonales. El tratamiento se inició 7 días después de la inyección de las células tumorales antes de lo cual, los ratones se aleatorizaron y se asignaron al grupo de tratamiento o al grupo control (6 por grupo). El Monepantel suspendido en HPMC 0.5 % se administró oralmente (100 μ L) a 50 o 100 mg/kg tres veces por semana. El grupo control se trató oralmente con el vehículo solamente.

Las Figuras 20-22 en general muestran el efecto de MPL sobre los xenoinjertos s.c en ratones desnudos femeninos. A los ratones se les inocularon, en el flanco izquierdo, 2.5 millones de células OVCAR-3 humanas en fase logarítmica de crecimiento. El crecimiento tumoral se monitoreó mediante las mediciones con un pie de rey y los volúmenes tumorales se determinaron a través de la medición de los diámetros ortogonales. El volumen estimado del tumor se calculó en base a la fórmula $1/2$ (LargoxAncho²), donde el ancho es la más corta de las dos mediciones ortogonales. El tratamiento se inició 7 días después de la inyección de las células tumorales antes de lo cual, los ratones se aleatorizaron y se asignaron al grupo de tratamiento o al grupo control (5-6 por grupo). El Monepantel suspendido en HPMC 0.5 % se administró por vía i.p. a 2.5 o 25 mg/kg (Figura 19), 25 y 50 mg/kg (Figura 20) u oralmente a 50 y 100 mg/kg, en todos los casos tres veces por semana. Los ratones del grupo control recibieron un volumen similar de HPMC al 0.5 % en una manera y tiempo exactamente similares.

La Figura 23 muestra como MPL induce necrosis en los tejidos tumorales. El tejido tumoral de los xenoinjertos subcutáneos en ratones desnudos que se trataron con MPL administrado oralmente en días alternos a 50 o 100 mg/kg día. Las imágenes histológicas de los tumores se muestran en tinción con hematoxilina y eosina (H&E; fila superior), lo

que indica necrosis profunda inducida por el fármaco (cabeza de flecha negra; aumento 10x). Una imagen representativa de la histología tumoral de tumores extirpados de ratones tratados con MPL que demuestran una necrosis extensa a la dosis más alta de 100 mg/kg (tumor s.c., tratamiento oral, 3 veces por semana durante 2 semanas).

La Figura 24 muestra células OVCAR-3 tratadas con MPL 10 μ M bajo condiciones de cultivo celular en los puntos de tiempo indicados. Análisis de la inmunoelectrotransferencia por Western de los extractos celulares preparados a partir de las células OVCAR-3 tratadas con MPL 10 μ M durante 1, 4 o 24 horas en condiciones de cultivo celular. Los resultados demuestran la inhibición de la fosforilación [activación] de ambos mTOR y sus vías de señalización descendente de p70S6K.

La Figura 25 muestra la expresión de proteínas en la línea de células de ovario humano OVCAR-3 tratadas in vitro con MPL. El análisis de la inmunoelectrotransferencia por Western de los extractos celulares preparados a partir de las células OVCAR-3 tratadas con MPL 0, 5, 10, 15 y 25 μ M durante 48 horas bajo condiciones de cultivo celular. Los resultados demuestran la regulación negativa de la expresión de c-Myc y de la ciclina D1.

La Figura 26 muestra el efecto inhibitorio de MPL sobre la expresión tumoral de la señalización relacionada con mTOR en las células tumorales OVCAR-3 tratadas con MPL. Análisis de la inmunoelectrotransferencia por Western de los extractos tumorales preparados a partir de los tumores OVCAR-3 crecidos s.c. en ratones desnudos femeninos. Los ratones se trataron a partir del día 8 después de la inoculación de las células por vía i.p., con MPL (25, 50 mg/kg suspendido en HPMC al 0.5 % administrado por vía i.p.) o el vehículo (0.5 % de HPMC), durante 3 semanas. 24 horas después de la última dosis, los tumores se extirparon y se congelaron a -80 °C. El análisis de inmunoelectrotransferencia por Western de los tumores demuestra la supresión de la señalización de mTOR. En los tumores extirpados a los ratones tratados con MPL se suprimió la expresión de proteínas de mTOR junto con c-Myc, las ciclinas D1 y E2 y CDK 2 y 4.

Las Figuras 27A y 27B muestran el efecto inhibitorio de MPL sobre la fosforilación de NF- κ B p65.

La Figura 28 muestra el efecto inhibitorio de MPL sobre la fosforilación de I κ B- α .

La Figura 29 muestra el efecto inhibitorio de MPL sobre la fosforilación de IKK.

La Figura 30 muestra que MPL causa una regulación negativa de la expresión de IL-6.

La Figura 31 muestra que MPL causa una regulación negativa de la expresión de TGF- β .

La Figura 32 muestra que MPL anula la expresión de NO.

Definiciones

"Halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo, preferentemente, flúor o cloro.

"Alquilo" significa un grupo hidrocarbonado alifático que puede ser lineal o ramificado y que comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquilo preferidos contienen aproximadamente 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono en la cadena. Con mayor preferencia, los grupos alquilo contienen aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono en la cadena. Ramificado significa que uno o más grupos alquilo inferiores tales como metilo, etilo o propilo se unen a una cadena alquilo lineal. "Alquilo inferior" significa un grupo que tiene aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono en la cadena la que puede ser lineal o ramificada. Los "Alquilo" pueden ser no sustituidos u opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes que pueden ser el mismo o diferente, cada sustituyente se selecciona independientemente del grupo que consiste en halógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo, ciano, hidroxilo, alcoxi, alquiltio, amino, -NH(alquilo), -NH(cicloalquilo), -N(alquilo)₂, carboxi y -C(O)O-alquilo. Los ejemplos no limitantes de grupos alquilo adecuados incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, y t-butilo.

"Arilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical hidrocarbonado aromático cíclico. Los grupos arilo preferidos tienen de seis a diez átomos de carbono. El término "arilo" incluye sistemas de anillos múltiples así como también sistemas de anillos únicos. Los grupos arilo preferidos para usar en la invención incluyen fenilo y naftilo. El término "arilo" incluye, además, anillos hidrocarbonados cíclicos fusionados que son parcialmente aromáticos (es decir, uno de los anillos fusionados es aromático y el otro es no aromático). Un grupo arilo ilustrativo que es parcialmente aromático es el indanilo.

"Heteroarilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un grupo cíclico o policíclico que tiene de cinco a doce átomos en el anillo seleccionados a partir de C, N, O y S, en donde al menos un heteroátomo del anillo es O, N o S, y en donde al menos uno de los anillos constituyentes es aromático. Los grupos heteroarilos ilustrativos para usar en la invención incluyen carbazolilo, carbolinilo, cromenilo, cinnolinilo, furanilo, benzofuranilo, benzofurazanilo, isobenzofuranilo, imidazolilo, benzimidazolilo, benzimidazolonoilo, indazolilo, indolilo, isoindolilo, indolinilo, indolazinoilo,

indinilo, oxadiazolilo, oxazolilo, benzoxazolilo, isoxazolilo, piranilo, pirazinilo, pirazolilo, benzopirazolilo, piridazinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolilo, quinolilo, isoquinolilo, tetrazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, tienilo, benzotioenilo, benzotiazolilo, quinoxalinilo, triazinilo y triazolilo, y N-óxidos de estos.

5 Un subgrupo del grupo heteroarilo tiene 5 átomos en el anillo. Los grupos heteroarilos ilustrativos en esta modalidad son pirazolilo, piridilo, tiazolilo e imidazolilo.

Otro subgrupo del grupo heteroarilo tiene 6 átomos en el anillo. Los grupos heteroarilos ilustrativos en esta modalidad son piridinilo y pirimidinilo.

10 El término "heteroarilo" incluye, además, anillos heterocíclicos cíclicos fusionados que son parcialmente aromáticos (es decir, uno de los anillos fusionados es aromático y el otro es no aromático). Un grupo heteroarilo ilustrativo que es parcialmente aromático es benzodioxol.

15 Cuando un grupo heteroarilo como se define en la presente descripción se sustituye, el sustituyente puede unirse a un átomo de carbono del anillo del grupo heteroarilo, o sobre un heteroátomo del anillo (es decir, un nitrógeno, oxígeno o azufre), que tiene una valencia que permite la sustitución. Preferentemente, el sustituyente se une a un átomo de carbono del anillo. De manera similar, cuando un grupo heteroarilo se define como un sustituyente en la presente descripción, el punto de unión puede estar en un átomo de carbono del anillo del grupo heteroarilo, o en un heteroátomo del anillo (es decir, un nitrógeno, oxígeno o azufre) que tiene una valencia que permite la unión. Preferentemente, la unión está en un átomo de carbono del anillo.

"Heteroátomo" significa un átomo seleccionado a partir de N, O, P y S. Donde sea necesario, cualquier valencia no designada se selecciona independientemente de H, OH, carbonilo, n-alquilo o alcoxi.

25 "n" puede ser 1 a 20, preferentemente 1 a 10, con mayor preferencia 1 a 6, y con la máxima preferencia 1 a 4.

"Alcoxi" significa un grupo alquil-O- en el que el grupo alquilo es como se describió anteriormente. Los ejemplos no limitantes de grupos alcoxi adecuados incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi y n-butoxi. La unión a la mitad parental es a través del oxígeno del éter.

35 "Sal aceptable farmacéuticamente" se refiere a sales de adición de ácido convencionales o sales de adición de bases que retienen la eficacia y propiedades biológicas de los compuestos de fórmula (I) y se forman a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos adecuados o bases inorgánicas. Las muestras de sales de adición ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido fosfórico y ácido nítrico y los derivados de ácidos orgánicos tales como ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fumárico y lo similar. Las muestras de sales de adición básicas incluyen aquellas derivadas de amonio, potasio, sodio e, hidróxidos de amonio cuaternario, tales como, por ejemplo, hidróxido de tetrametilamonio. La modificación química de un compuesto farmacéutico (es decir, fármaco) en una sal es una técnica bien conocida por los químicos farmacéuticos para obtener una mejorada estabilidad física y química, higroscopicidad, capacidad de flujo y solubilidad de los compuestos. Ver, por ejemplo, H. Ansel et. al., en *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (6ª edición, 1995) en las páginas 196 y 1456-1457.

45 "Aceptable farmacéuticamente", tal como un portador, excipiente, etc. aceptable farmacéuticamente, significa farmacológicamente aceptable y sustancialmente no tóxico para el sujeto al que se administra el compuesto particular.

"Sustituido", como en alquilo sustituido, significa que la sustitución puede ocurrir en una o más posiciones y, a menos que se indique de cualquier otra manera, que los sustituyentes en cada sitio de sustitución se seleccionan independientemente a partir de las opciones especificadas, lo que significa que más de un sustituyente pueden estar presentes simultáneamente en varios sitios.

55 Además, los "profármacos" y los "solvatos" de los compuestos de fórmula (I) se contemplan en la presente descripción. Una discusión sobre profármacos se proporciona en T. Higuchi y V. Stella, *Pro-drugs as Novel Delivery Systems* (1987) 14 de la A.C.S. Symposium Series, y en *Bioreversible Carriers in Drug Design*, (1987) Edward B. Roche, ed., American Pharmaceutical Association and Pergamon Press. El término "profármaco" significa un compuesto (por ejemplo, un precursor de fármaco) que se transforma in vivo para producir un compuesto de fórmula (I) o un metabolito, sal aceptable farmacéuticamente o solvato del compuesto. La transformación puede producirse por diversos mecanismos (por ejemplo, mediante procesos metabólicos o químicos). Una discusión sobre el uso de los profármacos se proporciona por T. Higuchi y V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, y en *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

65 "Metabolitos" se refiere a los intermediarios y productos del metabolismo.

Los compuestos de fórmula (I) pueden contener centros quirales o asimétricos, y, por tanto, existir en formas estereoisoméricas diferentes. Se pretende que todas las formas estereoisoméricas de los compuestos de fórmula (I) así como también las mezclas de estos, que incluyen mezclas racémicas, formen parte de la presente invención. Además, la presente invención abarca todos los isómeros geométricos y de posición. Las mezclas diastereoméricas pueden separarse en sus diastereómeros individuales sobre la base de sus diferencias químicas por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante cromatografía y/o cristalización fraccional. Los enantiómeros pueden separarse mediante la conversión de la mezcla enantiomérica en una mezcla diastereomérica por la reacción con un compuesto activo ópticamente apropiado (por ejemplo, un quiral auxiliar tal como un alcohol quiral o el ácido clorhídrico de Mosher), que separa los diastereómeros y que convierte (por ejemplo, mediante hidrólisis) los diastereómeros individuales en los enantiómeros puros correspondientes. Los enantiómeros pueden separarse, además, mediante el uso de una columna HPLC quiral. Los centros quirales de la presente invención pueden tener la configuración S o R como se define por la IUPAC 1974.

El uso de los términos "sal", o "solvato", se destina igualmente a la sal^o solvato de enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, isómeros de posición o racematos de los compuestos de la invención.

Como se usa en esta solicitud, la forma singular "un", "una" y "el" incluye referencias plurales a menos que el contexto lo señale claramente de cualquier otra manera.

Como se usa en la presente descripción, el término "que comprende" significa "que incluye". Las variaciones de la palabra "que comprende", tales como "comprende" y "comprenden", tienen significados correspondientemente variados. Por tanto, por ejemplo, una composición farmacéutica "que comprende" un compuesto de fórmula (I) puede consistir exclusivamente en ese compuesto o puede incluir uno o más componentes adicionales (por ejemplo, un portador aceptable farmacéuticamente, excipiente y/o diluyente).

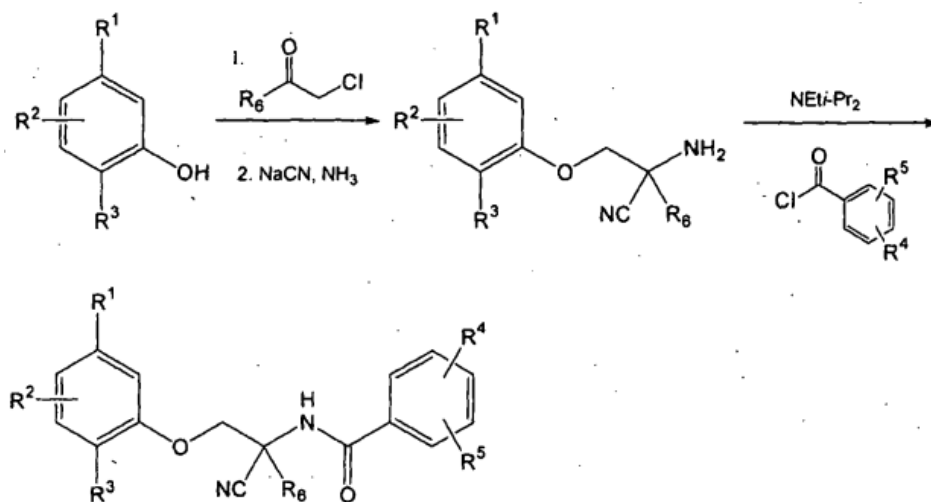
Como se usa en la presente descripción, el término "pluralidad" significa más de uno. En ciertos aspectos o modalidades específicas, una pluralidad puede significar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, o más, y cualquier número entero derivado de esta manera, y cualquier intervalo derivado de esta manera.

El término "cantidad con eficacia terapéutica" como se usa en la presente descripción, incluye dentro de su significado una cantidad no tóxica pero suficiente de un agente o composición para usar en la presente invención para proporcionar el efecto terapéutico deseado. La cantidad exacta requerida varía de sujeto a sujeto, en dependencia de factores tales como la especie a tratar, la edad, y condición general del sujeto, la gravedad de la afección a tratar, el agente particular que se administra, su modo de administración, etcétera. Por tanto, no es posible especificar una "cantidad eficaz" exacta aplicable a todas las modalidades. Sin embargo, para cualquier caso dado, una "cantidad eficaz" apropiada puede determinarse por cualquier experto en la técnica mediante el uso de la experimentación habitual.

Descripción detallada

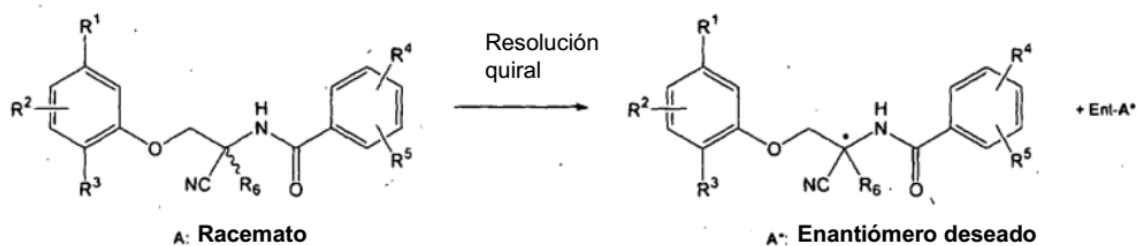
Los AAD (por ejemplo, de la fórmula (I)) son una clase de compuestos que pueden sintetizarse mediante el uso del conocimiento común de la metodología de síntesis orgánica. Por ejemplo, los AAD pueden sintetizarse mediante la derivatización de fenoles con cloroacetona, la reacción de Strecker y la acilación de las aminas resultantes con cloruros de aroilo (como se muestra en el esquema 1). Donde sea necesario, después puede obtenerse un enantiómero particular, por ejemplo, por resolución quiral (como se muestra en el Esquema 2).

Esquema 1:



(I)

Esquema 2:



A: Racemato

A*: Enantiómero deseado

(I)

(I)

Los AAD son una clase de productos químicos que se usaron anteriormente para tratar nemátodos resistentes a fármacos. Hasta la fecha, las investigaciones se enfocaron en MPL dirigido a los receptores nicotínicos de acetilcolina en nemátodos, y se ha utilizado ampliamente para el tratamiento de parásitos en rumiantes.

El mTOR (la diana de Rapamicina en células de mamíferos), conocido además, como la diana mecánica de rapamicina o proteína 1 asociada a la proteína 12 de unión a rapamicina FK506 (FRAP1), es una proteína que en humanos es codificada por el gen FRAP1. mTOR es una proteína quinasa serina/treonina (y específicamente pertenece a la familia de proteínas relacionadas con el fosfatidilinositol 3-quinasa) que regula el crecimiento celular, la proliferación celular, la motilidad celular, la supervivencia celular, la síntesis de proteínas y la transcripción. mTOR es la subunidad catalítica de los dos complejos moleculares mTORC1 y mTORC2. A pesar del hecho de que MPL es similar a la rapamicina en que interfiere con la vía de mTOR, la rapamicina no es, típicamente, un antihelmíntico lo que indica que MPL es muy diferente a los inhibidores conocidos de mTOR. Sin embargo, al igual que la rapamicina, los ADD tienen cualidades inmunosupresoras y actividad anticancerígena.

La familia de proteínas TOR tiene funciones pleiotrópicas y participa en la regulación de la iniciación de la transcripción del mRNA y de la traducción de proteínas en respuesta a las concentraciones intracelulares de aminoácidos y otros nutrientes esenciales, en la organización del citoesqueleto de actina, transporte a través de membranas, degradación de proteínas, señalización de PKC y biogénesis de los ribosomas. Además, la vía mTOR regula muchos de los procesos celulares principales y se implica en un número creciente de afecciones patológicas, que incluyen cáncer, obesidad, diabetes tipo 2 y neurodegeneración.

Hay dos complejos que comprenden las vías de mTOR: un complejo sensible a rapamicina (mTORC1), que se define por su interacción con la proteína accesoria Raptor (proteína reguladora asociada de mTOR); y un complejo insensible a la rapamicina (mTORC2), que se define por su interacción con RICTOR (compañía de mTOR insensible a la rapamicina). mTORC1 fosforila a los efectores bien caracterizados de mTOR, la S6 quinasa 1, (S6K1, conocida además

como p70S6K) y a la proteína 1 de unión al factor de iniciación 4E (eIF4E) eucariótico (4EBP1, que es codificado por el gen fosforilado de la proteína 1 estable al calor y al ácido regulada por la insulina (PHAS1)). mTORC2 controla el citoesqueleto de actina, así como AKT/PKB.

5 mTOR regula las vías de transducción de señales esenciales y se implica en el acoplamiento de los estímulos de crecimiento con la progresión del ciclo celular. En respuesta a las señales que inducen el crecimiento, las células quiescentes aumentan la traducción de un subconjunto de mRNA, cuyos productos proteicos son necesarios para la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular. PI3K y AKT son los elementos clave de la vía ascendente que vincula el acoplamiento de los ligandos de los receptores del factor de crecimiento con el estado de fosforilación y activación de mTOR. Con respecto al papel de la vía PI3K/AKT/mTOR en la génesis y proliferación de células cancerosas, se demostró que los elementos de la vía PI3K/AKT/mTOR se activan por la familia de receptores de superficie homólogos del oncogén viral de la leucemia eritroblástica (ERB), por los receptores del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), y por Ras oncogénico. La sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R) y su ligando, el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1), ocurre comúnmente en numerosos cánceres. Además, se demostró que diversos elementos de la vía PI3K/ AKT/mTOR se activan constitucionalmente en las malignidades. La hiperactivación de los elementos de la señalización PI3K/AKT/mTOR en malignidades deficientes en PTEN sugiere que los cánceres dependen con frecuencia de esta vía para el crecimiento y la subsistencia.

Después de la fosforilación, mTOR modula dos vías distintas de señalización descendente que controlan la traducción de subconjuntos específicos de mRNA que incluye S6K1 y 4EBP1. La activación de PI3K y/o AKT, y/o la pérdida de la función supresora de PTEN, es necesaria y suficiente para inducir la fosforilación tanto de S6K1 como de 4EBP1 a través de mTOR. Por tanto, los derivados de rapamicina bloquean la fosforilación de S6K1 y 4EBP1 en células que expresan PI3K activado o AKT o que carecen de PTEN. El proceso por el cual mTOR transmite las señales depende de su interacción con Raptor, una proteína evolutivamente conservada de 150 kDa que forma un complejo con mTOR y, además, se une a 4EBP1 y a S6K1. Aunque Raptor en sí mismo no es una quinasa, es necesario para la fosforilación de 4EBP1 y S6K1 que media la vía de mTOR.

4EBP1 es una proteína pequeña que reprime la iniciación de la traducción de proteínas a través de su asociación con eIF4E, la subunidad que se une al extremo cap del mRNA del complejo eIF4F. La sobreexpresión de eIF4E sola es suficiente para inducir la transformación celular. La unión de 4EBP a eIF4E depende del estado de fosforilación de 4EBP1.

Respecto a la interacción de mTOR con la traducción de las proteínas, en células inactivas y bajo condiciones de carencia de factores de crecimiento, el 4EBP1 no fosforilado se une fuertemente a eIF4E, lo que inhibe el inicio de la traducción de proteínas. En respuesta a estímulos proliferativos desencadenados por hormonas, factores de crecimiento, mitógenos, citoquinas y agonistas acoplados a proteínas G, 4EBP1 se fosforila en diversos sitios serina/treonina a través de la acción de mTOR y de otras quinasas, lo que promueve la disociación de eIF4E de 4EBP1. Después, el eIF4E libre puede unirse a eIF4G (una gran proteína de andamiaje), eIF4A (una helicasa de RNA dependiente del ATP) y eIF4B, lo que forma el complejo eIF4F de múltiples subunidades y facilita la traducción de proteínas dependiente del extremo cap. Esta cascada de eventos induce un aumento en la traducción de los mRNA con elementos reguladores/ en las regiones terminales 5' no traducidas (5'-UTR), que incluyen los mRNA que codifican para c-MYC, ciclina D1 y ornitina descarboxilasa. Por el contrario, la carencia de factores de crecimiento o el tratamiento con rapamicina resulta en la desfosforilación de 4EBP1, aumento de la unión a eIF4E y un deterioro concomitante de la iniciación de la traducción de mRNA con 5'-UTR que se requiere para la transición de la fase G1 a S del ciclo celular.

Existe abundante evidencia experimental que indica que mTOR es responsable directamente de la fosforilación de 4EBP1 y de la activación de eIF4E inducida por diversos estímulos mitogénicos. Por ejemplo, se demostró que la fosforilación de 4EBP1 en células tratadas con insulina se bloquea efectivamente por los inhibidores de mTOR. En efecto, una relación celular baja de 4EBP1 a eIF4E puede causar resistencia a los inhibidores de mTOR. Además, los sitios de 4EBP1 que son fosforilados por mTOR son idénticos a aquellos que induce el tratamiento con insulina, y se desfosforilan rápidamente después de la exposición a los inhibidores de mTOR. Algunas observaciones indican que mTOR podría, además, actuar indirectamente como inhibidor de una proteína serina/treonina fosfatasa, que funciona para desfosforilar 4EBP1 cuando las condiciones son apropiadas para la transición de la fase G1 a S.

Existe evidencia sustancial que indica que MPL se une a los receptores de acetilcolina en los nemátodos y que carece de actividad en células de mamífero. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, ahora se encontró, sorprendentemente, que MPL se une selectivamente a los receptores mTOR en células de mamífero.

Los compuestos de la presente invención actúan como inhibidores selectivos de la quinasa mTOR en células de mamífero por unión a los receptores mTOR, y por tanto, pueden usarse en el tratamiento de cualquier enfermedad relacionada con las vías de mTOR como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Muchos fármacos contra el cáncer, tales como la rapamicina y sus análogos, se unen a mTOR a través de un dominio que está separado del sitio catalítico y por tanto bloquean sólo un subconjunto de las funciones de mTOR. Tales fármacos podrían activar una vía de supervivencia dependiente de la vía de mTOR que conduzca al fracaso del tratamiento.

Por el contrario, los compuestos de la presente invención son de un tamaño similar al ATP (trifosfato de adenosina) y por tanto son capaces de competir con el ATP en el sitio catalítico de mTOR. Tal interacción de los compuestos de la presente invención en el sitio catalítico de mTOR debe inhibir todas las funciones dependientes de quinasa de mTORC1 y mTORC2, y sin el riesgo de la activación de una vía de supervivencia. En la Figura 8, se muestra que MPL disminuye los niveles de ATP en las células de cáncer de ovario, lo que indica fuertemente que MPL se une al sitio catalítico de mTOR.

MPL parece proporcionar una inhibición de mTOR altamente selectiva, debido a su baja toxicidad y, cuando se utiliza como un antihelmíntico, su tolerancia por los animales es en dosis de hasta 2000mg/kg. En modelos animales, los presentes inventores demostraron que los efectos anticancerígenos de MPL se observan a dosis sorprendentemente bajas, entre 5-50 mg/kg.

La señalización de mTOR es con frecuencia regulada positivamente en el cáncer. La interacción de MPL con los receptores mTOR en mamíferos puede ser selectiva para las células tumorales, lo que causa la inhibición del crecimiento tumoral (ver la Solicitud de Patente Provisional Australiana No. 2012901199 y PCT/AU2013/000290).

Por ejemplo, los presentes inventores encontraron sorprendentemente que los compuestos de fórmula (I), tales como MPL y MPL-SO₂, tienen actividad anticancerosa. Más específicamente, demostraron que los compuestos de fórmula (I), que incluyen MPL y MPL-SO₂, inhiben la proliferación celular y la formación de colonias de líneas celulares de cáncer. Por ejemplo, las líneas celulares de cáncer de ovario demostraron ser muy sensibles a los compuestos de fórmula (I), y es evidente que otras líneas celulares son, además, altamente sensibles. Estas incluyen líneas celulares de cáncer de mama, mesotelioma, cáncer de próstata y de glioblastoma. MPL es muy eficaz contra las células de cáncer de próstata PC-3 y DU 145 insensible a los andrógenos, resistentes a la quimioterapia. De manera similar, la replicación de células PET y YOU (mesotelioma) y células U87 (glioblastoma), las que, además, son altamente resistentes a la quimioterapia, se suprime marcadamente por MPL.

Los presentes inventores demostraron que MPL y sus análogos tienen aplicación en las siguientes enfermedades dependientes de mTOR:

- La señalización de mTOR intersecta con la patología de la enfermedad de Alzheimer (AD) en diversos aspectos, lo que sugiere su papel potencial como un contribuyente a la progresión de la enfermedad. En general, los hallazgos demuestran hiperactividad de la señalización de mTOR en los cerebros de AD. Por ejemplo, los estudios postmórtem del cerebro humano con AD revelan desregulación en PTEN, Akt, S6K y mTOR;
- Los estudios que usan modelos murinos de la enfermedad de Huntington demuestran que el tratamiento con rapamicina facilita el aclaramiento de los agregados de Huntington. De manera similar MPL puede eliminar tales agregados lo que proporciona tratamientos nuevos para esta afección;
- Enfermedades relacionadas con la edad;
- Rechazo al trasplante;
- Enfermedad inflamatoria crónica (por ejemplo, artritis reumatoide);
- Enfermedades de almacenamiento de glucógeno;
- Selectivo para ciertos cánceres;
- Lupus Sistémico: la señalización de mTOR se aumenta en células T de SLE y se demostró que la inhibición de la señalización de mTOR con rapamicina es eficaz en el tratamiento del SLE humano. Los pacientes con SLE tratados con rapamicina demuestran niveles basales de calcio bajos y disminución del flujo de calcio después de la estimulación del TCR, pero no muestran un cambio en la función mitocondrial, lo que indica la especificidad del tratamiento con rapamicina en esta manifestación de la enfermedad;
- Inflamación y activación inmune;
- Anemia;
- Leucopenia;
- Trombocitopenia;
- Recubrimiento de endoprótesis;
- Insuficiencia renal;
- Obesidad;
- Diabetes/resistencia a la insulina;
- Hígado graso no alcohólico;
- Riñón poliquístico;
- Enfermedad de Parkinson: el inhibidor de mTORC1 rapamicina, impidió el desarrollo de la discinesia sin afectar la eficacia terapéutica de L-DOPA. Por tanto, la cascada de señalización de mTORC1 representa una diana para el diseño de terapias antiparkinsonianas;
- Fibrosis (tales como fibrosis hepática, cardíaca y pulmonar). Debido a la sensibilidad de los fibroblastos a MPL, la relación entre PI3K/mTOR y TGFβ, y el efecto sobre la expresión/actividad de la lisil oxidasa (LOX), MPL puede usarse en el tratamiento de la fibrosis. En pacientes con insuficiencia cardíaca/fibrosis se encuentra una expresión cardíaca aumentada de LOX, y de manera similar, en una serie de enfermedades pulmonares y renales/LOX/fibroblastos. Adicionalmente, la fibrosis es un factor importante que contribuye en diversos tipos de cánceres, como el cáncer de mama y el cáncer de páncreas.

Sin estar limitados por la teoría, se cree que la actividad de los compuestos de la presente invención actúa mediante la unión al sitio catalítico de mTOR.

5 Composiciones, medicamentos y estuches

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas, medicamentos y estuches que comprenden al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal aceptable farmacéuticamente o solvato de dicho compuesto y al menos un portador aceptable farmacéuticamente. Para la preparación de composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos descritos por esta invención, los portadores inertes, aceptables farmacéuticamente pueden ser sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, tabletas, gránulos de dispersión, cápsulas, sellos y supositorios. Los polvos y las tabletas pueden comprender de aproximadamente 5 a aproximadamente 95 por ciento del ingrediente activo. Los portadores sólidos adecuados se conocen en la técnica, por ejemplo, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar o lactosa. Las tabletas, polvos, sellos y cápsulas pueden usarse como formas de dosis sólidas adecuadas para la administración oral. Los ejemplos de portadores aceptable farmacéuticamente y métodos de fabricación para diversas composiciones pueden encontrarse en A. Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, (1990), Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania.

Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, agua o soluciones de agua y propilenglicol para inyección parenteral o adición de edulcorantes u opacificadores para las soluciones orales, suspensiones y emulsiones. Las preparaciones en forma líquida pueden incluir, además, las soluciones para la administración intranasal.

Las preparaciones de aerosol adecuadas para la inhalación pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo, que pueden estar en combinación con un portador aceptable farmacéuticamente, tal como un gas inerte comprimido, por ejemplo, nitrógeno. Se incluyen, además, las preparaciones en forma sólida que pretenden ser convertidas, poco antes del uso, a preparaciones en forma líquida para la administración oral o parenteral. Tales formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

Los compuestos de la invención pueden, además, suministrarse transdérmicamente. Las composiciones transdérmicas pueden tomar la forma de cremas, lociones, aerosoles y/o emulsiones y pueden incluirse en un parche transdérmico de tipo matriz o reservorio como los convencionales en la técnica para este propósito.

Los compuestos de la invención pueden, además, suministrarse subcutáneamente.

Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) es administrado oralmente.

Las composiciones y los medicamentos de la presente invención pueden comprender un portador, adyuvante, excipiente y/o diluyente aceptable farmacéuticamente. Los portadores, diluyentes, excipientes y adyuvantes deben ser "aceptables" en términos de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición o medicamento, y generalmente no son nocivos para el receptor de estos. Los ejemplos no limitantes de los portadores o diluyentes aceptables farmacéuticamente son agua desmineralizada o destilada; solución salina; aceites basados en vegetales tales como el aceite de maní, aceite de girasol, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo, tales como el aceite de maní, aceite de girasol, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de cacahuete o coco, aceites de siliconas, que incluye los polisiloxanos, tales como metil polisiloxano, fenil polisiloxano y metilfenil polisiloxano; siliconas volátiles; aceites minerales tales como parafina líquida, parafina suave, o escualeno; derivados de la celulosa tales como metil celulosa, etil celulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, o hidroxilpropilmetilcelulosa; alcanoles inferiores, por ejemplo, etanol o isopropanol; aralcanoles inferiores; polialquilenglicoles o alquilenglicoles inferiores, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3 butilenglicol o glicerina; ésteres de ácidos grasos tales como palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo u oleato de etilo; polivinilpirrolidona, agar, goma tragacanto o goma acacia, y gel de petróleo. Típicamente, el portador o los portadores formarán de aproximadamente 10 % a aproximadamente 99.9 % en peso de la composición o medicamento.

La composición y los medicamentos de la presente invención pueden estar en una forma adecuada para la administración por inyección (por ejemplo, para administración parenteral que incluye inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa), para la administración oral (tales como cápsulas, tabletas, comprimido y elixires, por ejemplo) para la administración tópica (por ejemplo, en forma de una pomada, crema o loción, o una forma adecuada para el suministro como colirio), o para inhalación intranasal (por ejemplo, en forma de aerosoles).

Para la administración como una solución o suspensión inyectable, los diluyentes o portadores aceptables parenteralmente no tóxicos pueden incluir, solución de Ringer, solución salina isotónica, solución salina tamponada con fosfato, etanol y 1,2 propilenglicol. Los métodos para preparar las composiciones y medicamentos administrables parenteralmente son evidentes para aquellos expertos en la técnica, y se describen con mayor detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 15ta edición., Mack Publishing Company, Easton, Pa.

- Para la administración oral, algunos ejemplos de portadores adecuados, diluyentes, excipientes y adyuvantes incluyen aceite de maní, parafina líquida, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, alginato sódico, goma acacia, goma tragacanto, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, gelatina y lecitina. Además, estas formulaciones orales pueden comprender agentes aromatizantes y colorantes adecuados. Cuando se usan en forma de cápsula, las cápsulas pueden recubrirse con compuestos tales como monoestearato de glicerilo o estearato de glicerilo que retardan la desintegración. Los adyuvantes incluyen típicamente, emolientes, emulsionantes, agentes espesantes, conservantes, bactericidas y agentes taponantes.
- Las formas sólidas para la administración oral pueden contener aglutinantes aceptables en la práctica farmacéutica humana y veterinaria, edulcorantes, agentes disgregantes, diluyentes, saborizantes, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes de retardo del tiempo. Los aglutinantes adecuados incluyen goma acacia, gelatina, almidón de maíz, goma tragacanto, alginato sódico, carboximetilcelulosa o polietilenglicol. Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los agentes disgregantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma guar, goma xantano, bentonita, ácido alginico o agar. Los diluyentes adecuados incluyen lactosa, sorbitol, manitol, dextrosa, caolín, celulosa, carbonato cálcico, silicato cálcico o fosfato dicálcico. Los agentes saborizantes adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gualteria, saborizante de cereza, naranja o frambuesa. Los agentes de recubrimiento adecuados incluyen polímeros o copolímeros de ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras, alcoholes grasos, zeína, goma laca o gluten. Los conservantes adecuados incluyen benzoato sódico, vitamina E, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno o bisulfito sódico. Los lubricantes adecuados incluyen estearato magnésico, ácido esteárico, oleato sódico, cloruro sódico o talco. Los agentes de retardo del tiempo adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.
- Las formas líquidas para la administración oral pueden comprender, además de los agentes anteriores, un portador líquido. Los portadores líquidos adecuados incluyen agua, aceites tales como aceite de oliva, aceite de maní, aceite de sésamo, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de cacahuete, aceite de coco, parafina líquida, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, etanol, propanol, isopropanol, glicerol, alcoholes grasos, triglicéridos o mezclas de estos.
- Las suspensiones para la administración oral pueden comprender, además, agentes dispersantes y/o agentes de suspensión. Los agentes de suspensión adecuados incluyen carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, alginato sódico o alcohol acetilo. Los agentes dispersantes adecuados incluyen lecitina, ésteres de polioxietileno de ácidos grasos tales como ácido esteárico, polioxietileno sorbitol mono o di oleato, estearato o laurato, polioxietileno sorbitán mono o di oleato, estearato o laurato y lo similar.
- Las formulaciones para administración oral pueden comprender uno o más agentes emulsionantes. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen agentes dispersantes como se ejemplificó anteriormente o gomas naturales tales como goma guar, goma acacia o goma tragacanto.
- Las formulaciones tópicas de la presente invención pueden comprender un ingrediente activo junto con uno o más portadores aceptables, y opcionalmente cualquier otro ingrediente terapéutico. Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas adecuadas para la penetración a través de la piel hasta el sitio donde se requiera el tratamiento, tales como linimentos, lociones, cremas, pomadas, o pastas y gotas adecuadas para la administración a los ojos, oídos o nariz.
- De conformidad con la presente invención, las gotas pueden comprender soluciones acuosas u oleosas estériles o suspensiones. Estas pueden prepararse mediante la disolución del ingrediente activo en una solución acuosa de un agente bactericida y/o fungicida y/o cualquier otro preservante adecuado, y que incluya opcionalmente un agente tensoactivo. Después, la solución resultante puede clarificarse por filtración, transferirse a un recipiente adecuado y esterilizarse. La esterilización puede lograrse mediante autoclave o con el mantenimiento a 90 °C-100 °C durante media hora, o por filtración, seguido de transferencia a un recipiente por una técnica aséptica.
- Los ejemplos de agentes bactericidas y fungicidas adecuados para su inclusión en las gotas son el nitrato o acetato de fenilmercurio (0.002 %), cloruro de benzalconio (0.01 %) y acetato de clorhexidina (0.01 %). Los solventes adecuados para la preparación de una solución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.
- De conformidad con la presente invención, las lociones incluyen aquellas adecuadas para la aplicación en la piel o los ojos. Una loción ocular puede comprender una solución acuosa estéril que contiene opcionalmente un bactericida y puede prepararse por métodos similares a aquellos descritos anteriormente en relación a la preparación de las gotas. Las lociones o linimentos para aplicar a la piel pueden incluir, además, un agente para acelerar el secado y enfriar la piel, tales como un alcohol o acetona, y/o una crema hidratante tal como el glicerol o un aceite tal como el aceite de ricino, o aceite de cacahuete.
- Las cremas, ungüentos o pastas de conformidad con la presente invención son formulaciones semisólidas del ingrediente activo para aplicación externa. Ellas pueden elaborarse mediante la mezcla del ingrediente activo en forma finamente dividida o en polvo, solo o en solución o suspensión en un fluido acuoso o no acuoso, con una base de grasa o no grasa. La base puede comprender hidrocarburos tales como parafina dura, blanda o líquida, glicerol, cera de abejas, un jabón metálico, un mucílago, un aceite de origen natural, tales como almendra, maíz, cacahuete, ricino o

aceite de oliva, la grasa de lana o sus derivados o un ácido graso tal como los ácidos esteárico u oleico, junto con un alcohol tal como el propilenglicol o un macrogel.

Las composiciones y medicamentos de la presente invención pueden incorporar cualquier surfactante adecuado tales como un surfactante aniónico, catiónico, o no iónico, tales como los ésteres de sorbitán o los derivados de polioxietileno de estos. Los agentes de suspensión tales como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tales como sílices silíceas, y, además, otros ingredientes, tal como lanolina, pueden incluirse.

Las composiciones y medicamentos de la presente invención pueden administrarse en la forma de un liposoma. Los métodos adecuados para formar liposomas se conocen en la técnica, y una relación a esta referencia específica se hace en Prescott, (Ed), (1976), "Methods in Cell Biology", Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, N.Y. p.33 et seq.

Los ingredientes activos suplementarios tales como adyuvantes o modificadores de la respuesta biológica pueden incorporarse, además, en las composiciones y medicamentos de la presente invención.

Cualquier adyuvante adecuado puede incluirse en las composiciones y medicamentos de la presente invención. Por ejemplo, puede usarse un adyuvante basado en aluminio. Los adyuvantes basados en aluminio adecuados incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y combinaciones de estos. Otros ejemplos específicos de adyuvantes basados en aluminio que pueden usarse se describen en la Patente Europea Núm. 1216053 y en la Patente de los EE.UU. núm. 6,372,223. Otros adyuvantes adecuados incluyen los adyuvantes completo e incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan); Adyuvante Merck 65 (Merck y Company, Inc., Rahway, N.J.); AS-2 (SmithKline Beecham, Filadelfia, Pa.); sales de aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o zinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivatizados catiónicamente o aniónicamente; polifosfacenos; microesferas biodegradables; monofosforil lípido A y quil A; emulsiones de aceite en agua que incluye aquellas descritas en la Patente Europea Núm. 0399843, Patente de EE.UU. Núm. 7.029.678 y Publicación PCT Núm. WO 2007/006939; y/o citoquinas adicionales, tales como GM-CSF o interleuquina 2, 7 o 12, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), monofosforil lípido A (MPL), toxina de cólera (CT) o sus subunidades constituyentes, enterotoxina lábil al calor (LT) o sus subunidades constituyentes, adyuvantes ligandos del receptor tipo toll tales como lipopolisacáridos (LPS) y derivados de este (por ejemplo, monofosforil lípido A y monofosforil lípido A 3-desacilado) muramil dipéptido (MDP) y la proteína F del Virus Sincitial Respiratorio (RSV).

Además, en la presente descripción se describe un estuche que comprende una cantidad con eficacia terapéutica de al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal aceptable farmacéuticamente, o solvato de dicho compuesto y un portador, vehículo o diluyente aceptable farmacéuticamente.

Otro aspecto de esta descripción es un estuche que comprende una cantidad de al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal o solvato aceptable farmacéuticamente de dicho compuesto y una cantidad de al menos una terapia anticancerosa y/o un agente anticanceroso enumerados anteriormente, en donde las cantidades de los dos o más ingredientes resultan en el efecto terapéutico deseado.

Los estuches descritos en la presente descripción pueden comprender componentes para ayudar a realizar los usos descritos en la presente descripción, tales como, por ejemplo, dispositivo(s) de administración, tampón(es) y/o diluyente(s). Los estuches pueden incluir recipientes para colocar los diversos componentes e instrucciones para usar los componentes del estuche en los métodos descritos en la presente descripción.

En ciertas modalidades, los estuches pueden ser estuches combinados.

En otras modalidades, los estuches pueden ser estuches fragmentados.

Dosificaciones y vías de administración

Los agentes, composiciones y medicamentos pueden administrarse a un receptor por vías estándar, que incluyen, pero no se limitan a, vías parenterales (por ejemplo, intravenosa, intraespinal, subcutánea o intramuscular), oral, tópica o mucosal (por ejemplo intranasal). En algunas modalidades, ellos pueden administrarse a un receptor aparte o en combinación con otros agentes terapéuticos adicionales. En tales modalidades, la administración puede ser simultánea o secuencial.

Generalmente, los agentes, composiciones y medicamentos pueden administrarse de una manera compatible con la vía de administración y las características físicas del receptor (que incluye el estado de salud) y de esta manera que se induzca el efecto deseado(s) (es decir, terapéuticamente eficaz, inmunogénico y/o protector). Por ejemplo, la dosificación apropiada puede depender de una variedad de factores que incluyen, pero no se limitan a, las características físicas del sujeto (por ejemplo, edad, peso, sexo), si el agente, composición o medicamento se usa como agente único o como terapia adyuvante, la progresión (es decir, estado patológico) del cáncer a tratar, y otros factores fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

Se describen, por ejemplo, diversas consideraciones generales para determinar una dosificación apropiada de los agentes, composiciones y medicamentos; En Gennaro et al. (Eds), (1990), "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, USA; y Gilman y otros, (Eds), (1990), "Goodman And Gilman's: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica", Pergamon Press.

Una ventaja sorprendente de la presente invención es que los compuestos de fórmula (I) generalmente reflejan una baja toxicidad. Por ejemplo, MPL tiene una dosis única de toxicidad por encima de 2000 mg por kg de peso corporal. Como tal, un agente, composición o medicamento para usar en la presente invención puede administrarse a un paciente como una dosis única de una cantidad de hasta, y que incluye, 2000 mg de componente(s) activo(s) por kg de peso corporal. Por otra parte, otra ventaja sorprendente de usar los compuestos descritos en la presente descripción para el tratamiento del cáncer es la tolerancia clínica generalmente alta de los compuestos de fórmula (I). Por ejemplo, una dosis de 1000 mg de MPL por kg de peso corporal por 24 horas es bien tolerada en mamíferos. Como tal, un agente, composición o medicamento para usar en la presente invención puede administrarse a un paciente en una cantidad de hasta, y que incluye, 1000 mg de componente(s) activo(s) por kg de peso corporal por 24 horas.

Generalmente, se espera que una dosis eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 0.0001 mg a aproximadamente 1000 mg del componente(s) activo por kg de peso corporal por 24 horas; típicamente, aproximadamente 0.001 mg a aproximadamente 750 mg por kg de peso corporal por 24 horas; aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por 24 horas; aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por 24 horas; o aproximadamente 1.0 mg a aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal por 24 horas. Más típicamente, un intervalo de dosis efectiva se espera que esté en el intervalo de aproximadamente 1.0 mg a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por 24 horas; aproximadamente 1.0 mg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal por 24 horas; aproximadamente 1.0 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal por 24 horas; aproximadamente 1.0 mg a aproximadamente 25 mg por kg de peso corporal por 24 horas; aproximadamente 5.0 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal por 24 horas; aproximadamente 5.0 mg a aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal por 24 horas; o aproximadamente 5.0 mg a aproximadamente 15 mg por kg de peso corporal por 24 horas.

Por ejemplo, una dosificación preferida puede ser de aproximadamente 10-100 mg del compuesto de fórmula (I) por kg de peso corporal por 24 horas. Además, una dosificación preferida puede ser de aproximadamente 50 mg de un compuesto de fórmula (I) por kg de peso corporal por 24 horas.

Además, será evidente para un experto en la técnica que la cantidad óptima y el espaciado de las dosis individuales pueden determinarse por la naturaleza y extensión del estado de la enfermedad o afección a tratar, la forma, ruta y el sitio de administración, y la naturaleza del sujeto particular bajo tratamiento. Las dosis óptimas pueden determinarse mediante el uso de técnicas convencionales.

En muchos casos (por ejemplo, aplicaciones preventivas), puede desearse tener varias o múltiples administraciones de un agente, composición o medicamento de la presente invención que pueden administrarse, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces. Las administraciones pueden ser a intervalos de aproximadamente una a aproximadamente doce semanas, y en ciertas modalidades a intervalos de aproximadamente una a aproximadamente cuatro semanas. Se contempla, además, la readministración periódica.

Además, resultará evidente para un experto en la técnica que el curso óptimo de administración puede determinarse mediante el uso de pruebas convencionales para determinar el curso de tratamiento.

Cuando dos o más entidades (por ejemplo, agentes o medicamentos) se administran a un sujeto "conjuntamente", ellas pueden administrarse en una composición única al mismo tiempo, o en composiciones separadas al mismo tiempo, o en composiciones separadas, en tiempos diferentes.

Ciertas modalidades de la presente invención implican la administración de los agentes, composiciones o medicamentos en múltiples dosis separadas. Por consiguiente, los medios descritos en la presente descripción para el tratamiento profiláctico y terapéutico abarcan la administración de múltiples dosis separadas a un sujeto, por ejemplo, durante un periodo de tiempo definido. Por consiguiente, en algunas modalidades los medios incluyen administrar una dosis inicial, que puede seguirse con una dosis de refuerzo. La dosis de refuerzo puede ser para el propósito de revacunación. En diversas modalidades, el agente, composición o medicamento se administra al menos una vez, dos veces, tres veces o más.

Generalmente, los agentes, composiciones y medicamentos pueden administrarse en una cantidad eficaz para conseguir el propósito deseado. Más específicamente, ellos pueden administrarse en una cantidad con eficacia terapéutica lo que significa una cantidad eficaz para prevenir el desarrollo de, o para aliviar los síntomas existentes, de una afección o enfermedad diana. La determinación de las cantidades eficaces está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. Por ejemplo, una dosis con eficacia terapéutica de los agentes, composiciones y medicamentos puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración circulante que incluye la IC50 como se determina en el

cultivo celular. Tal información puede utilizarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos y en otros sujetos mamíferos.

Una dosis con eficacia terapéutica se refiere a esa cantidad del agente, composición o medicamento para prevenir el desarrollo de síntomas, mejorar los síntomas y/o prolongar la supervivencia del sujeto bajo tratamiento. La toxicidad y la eficacia terapéutica de los agentes, composiciones y medicamentos pueden determinarse mediante los procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares y/o en animales de experimentación (por ejemplo, mediante la determinación de la LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED50 (la dosis con eficacia terapéutica) en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación entre LD50 y ED50. Se prefieren los agentes, composiciones y medicamentos que exhiben altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos de tales pruebas de cultivos celulares y de estudios animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificaciones para usar en humanos y otros mamíferos. La dosificación de estos compuestos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo en dependencia de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden seleccionarse sin dificultad por un médico individual en vista de la condición del sujeto (ver, por ejemplo, Fingl y otros(1975), en "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica", Cap. 1 pg.1). La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar los niveles plasmáticos del ingrediente activo suficiente para lograr y mantener los efectos terapéuticos deseados y/o una concentración efectiva mínima (MEC). Las dosificaciones necesarias para lograr la MEC dependerán de la vía de administración y de otras características individuales. Los ensayos biológicos y las determinaciones por HPLC pueden usarse para determinar las concentraciones plasmáticas.

Además, los intervalos de dosificación pueden determinarse mediante el uso del valor MEC. Generalmente, los agentes, composiciones y medicamentos pueden administrarse mediante un régimen que mantenga los niveles plasmáticos por encima del MEC durante aproximadamente entre un 10 %-90 % del tiempo, preferentemente entre 30 %-90 % y más preferentemente entre aproximadamente 50 %-90 %. En las modalidades donde se usa la administración local o un consumo selectivo, la concentración local efectiva del fármaco puede no relacionarse con la concentración plasmática.

Los compuestos descritos en la presente descripción pueden ser útiles, además, en combinación (administrados juntos o secuencialmente) con uno o más de los tratamientos anticancerígenos tales como la radioterapia, y/o uno o más agentes anticancerígenos seleccionados del grupo que consiste en agentes citostáticos, agentes citotóxicos (tales como, por ejemplo, pero sin limitarse a, agentes que interaccionan con el DNA (tales como cisplatino o doxorubicina); taxanos (por ejemplo, taxotere, taxol); inhibidores de topoisomerasa II (tales como etopósido); inhibidores de topoisomerasa I (tales como irinotecán (o CPT-11), camptostar o topotecán); agentes que interaccionan con la tubulina (tales como paclitaxel, docetaxel o las epotilonas); agentes hormonales (como el tamoxifeno); inhibidores de la timidilato sintasa (tales como 5-fluorouracilo); antimetabolitos (tales como metotrexato); agentes alquilantes (tales como temozolomida (TEMODAR (TM) de Schering-Plough Corporation, Kenilworth, Nueva Jersey), ciclofosfamida); inhibidores de la proteína farnesil transferasa (tales como SARASAR (TM) (4-[2-[4-[(11R)-3,10-dibromo-8-cloro-6,11-dihidro-5H-benzo[5,6]-ciclohepta[1,2-b]piridin-11 il]-1-piperidinil]-2-oxoetil]-1-piperidincarboxamida o SCH 66336 de Schering-Plough Corporation, Kenilworth, Nueva Jersey), tipifamib (Zamestra® O R115777 de Janssen Pharmaceuticals), L778.123 (un inhibidor de la proteína farnesil transferasa de Merck & Company, Whitehouse Station, Nueva Jersey), BMS 214662 (un inhibidor de la proteína farnesil transferasa de Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals, Princeton, New Jersey); inhibidores de la transducción de señales (tales como Iressa (de Astra Zeneca Pharmaceuticals, Inglaterra), Tarceva (inhibidores de la quinasa EGFR), anticuerpos contra EGFR (por ejemplo, C225), GLEEVEC (TM) (inhibidor de quinasa C-abl de Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, New Jersey), interferones tales como, por ejemplo, intrón (de Schering-Plough Corporation), Peg-Intron (de Schering-Plough Corporation), combinaciones de terapias hormonales, combinaciones de aromatasa; Ara-C, adriamicina, Cytosan y gemcitabina.

Sujetos

Los medios profilácticos y terapéuticos de la presente invención pueden aplicarse a cualquier sujeto adecuado. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto mamífero. Por ejemplo, el sujeto puede ser un ratón, rata, perro, gato, vaca, oveja, caballo o cualquier otro mamífero de importancia social, económica o de investigación. Por tanto, el sujeto puede ser un mamífero tal como, por ejemplo, un mamífero humano o no humano.

La presente invención se describirá ahora con referencia a ejemplos específicos, que no deben ser interpretados como limitantes de ninguna manera.

Ejemplos

Materiales y Métodos

Líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer de ovario humano OVCAR-3, SKOV-3 y A2780 y los cultivos primarios de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y todas las demás líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y se mantuvieron de acuerdo a sus instrucciones. Los astrocitos y las líneas de células de glioma fueron donadas amablemente por el Dr. Kerry McDonald de Lowy Cancer Research Center, de la Universidad de Nueva Gales del Sur, Australia. Los astrocitos y las líneas de células de glioma fueron donadas amablemente por el Dr. Kerry McDonald de Lowy Cancer Research Center, de la Universidad de Nueva Gales del Sur, Australia.

Ensayos de proliferación celular

La proliferación celular se evaluó mediante el uso del ensayo de sulforrodamina B (SRB). Las células se sembraron en placa de 96 pocillos (2 000-3 000 células/pocillo) se trataron con MPL (0, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{mol/L}$) durante 72 horas. Después, las células se fijaron, se lavaron y se tiñeron con 100 μl de SRB al 0.4 % (p/v) disuelto en ácido acético al 1 %. El colorante no unido se eliminó mediante cinco lavados con ácido acético al 1 % antes de secar al aire. La SRB unida se solubilizó con 100 μl de Tris base 10 mM (pH 10.5) y se leyó la absorbancia a 570 nm. El mismo procedimiento se usó, exactamente, para evaluar MPL-SO₂. Ambos agentes se disolvieron en etanol y se diluyeron con medio para proporcionar las concentraciones finales requeridas para los ensayos de cultivo celular.

Ensayo de viabilidad celular

Para los experimentos de viabilidad, las células sembradas en placas de 6 pocillos se expusieron a monepantel (MPL) a concentraciones de 0, 1, 10, 50 y 100 μM durante 24, 48 o 72 horas. El monepantel (donado por Novartis, Basilea, Suiza) se disolvió en etanol al 100 % y después se diluyó con el medio de cultivo celular. Al final del período de tratamiento, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se contaron mediante el uso de azul de Tripán y de hemocitómetro. Todos los puntos experimentales se establecieron en cuadruplicado y cada experimento se realizó al menos dos veces.

Ensayo de formación de colonias

Para el ensayo de formación de colonias, se sembraron 5×10^6 células, tales como células OVCAR-3 o A2780, en placas Petri de 100 mm y se dejaron adherirse a la placa durante la noche. Los medios de cultivo se aspiraron y las células, en fase de crecimiento exponencial, se incubaron con varias concentraciones de MPL durante 72 horas. En este punto, el medio se aspiró, las placas se lavaron con PBS y se añadió medio libre de fármaco a cada placa. Los medios de cultivo se cambiaron dos veces por semana durante 3 semanas. Después de esto, las placas se lavaron suavemente con PBS y las células se fijaron con etanol al 100 % y se tiñeron con una solución filtrada de violeta cristal al 0.5 %. Las colonias consistentes en más de 50 células se contaron bajo un microscopio invertido.

Análisis del ciclo celular

El efecto de MPL sobre el ciclo celular se determinó mediante el uso de protocolos y procedimientos estándar para el análisis de la citometría de flujo. Brevemente, se sembraron 0.7×10^6 millones de células en frascos de 25 cm³ y se dejaron adherirse durante la noche, después se trataron con MPL durante 24 o 48 horas. Las células se recolectaron mediante tripsinización y se unieron con las células flotantes en el medio. Las suspensiones celulares se centrifugaron, se lavaron con PBS y se fijaron con metanol. Después, las células se lavaron, se suspendieron en yoduro de propodio y ribonucleasa A en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se analizaron por citometría de flujo (Becton Dickinson FACSORT).

Análisis de inmunoelectrotransferencia por Western

La expresión de proteínas en células se determinó mediante el análisis de inmunoelectrotransferencia por Western. Después del tratamiento con las concentraciones indicadas de MPL, se prepararon extractos celulares y se incubaron con anticuerpos para cdk2, cdk4, ciclina A, ciclina E, PARP-1 (diluciones 1:1000, Cell Signalling Technology) y p53 (diluciones 1:200; Santa Cruz Biotechnology). La carga comparable de proteínas en el gel se verificó mediante la reincubación de la inmunoelectrotransferencia con un anticuerpo de GAPDH (diluciones 1:30000; Sigma-Aldrich).

En otros experimentos, después del tratamiento con las concentraciones indicadas de MPL, se prepararon extractos celulares y se incubaron con anticuerpos para c-Myc, ciclina D1, ciclina E, cdk2, cdk4, IGF-1R (Cell Signalling Technology), y (Santa Cruz Biotechnology, Australia). La carga comparable de proteínas en el gel se verificó mediante la reincubación de la inmunoelectrotransferencia con un anticuerpo de GAPDH (Sigma-Aldrich, Sidney, Australia).

Experimentos in vivo

Los ratones desnudos femeninos (de 6 semanas de edad) se adquirieron de Biological Resources (Facultad de Medicina, Universidad de Nueva Gales del Sur). Una aprobación del comité institucional de ética animal cubrió todos los procedimientos que se realizaron en ratones. Brevemente, se inyectaron por vía s.c. en el flanco izquierdo de cada ratón, 2.5×10^6 células de OVCAR-3 en fase logarítmica de crecimiento. Los animales se pesaron una vez por semana, mientras que sus volúmenes tumorales se determinaron dos veces por semana. El crecimiento tumoral se monitoreó

mediante las mediciones con pie de rey de los diámetros ortogonales, y se calculó el volumen estimado del tumor en base a la fórmula $1/2 (LargoxAcncho^2)$, donde el ancho es la más corta de las dos mediciones ortogonales. Basándose en la aprobación del comité de ética institucional, los ratones se sacrificaron mediante eutanasia antes de que el volumen del tumor alcanzara 500 mm³. El tratamiento se inició el día 8 después de la inyección de células tumorales cuando los ratones se aleatorizaron y se asignaron al grupo de tratamiento o al grupo control (6 por grupo). El monepantel se suspendió en hidroperoximetil celulosa estéril al 0.5 % (p/v) (HPMC). El fármaco se administró por vía i.p. 3 veces por semana a 25 o 50 mg/kg. El grupo control se trató con vehículo estéril (0.5 % de HPMC). Los ratones se trataron durante un periodo de 3 semanas. Veinticuatro horas después de la última administración del fármaco, los ratones se sacrificaron y sus tumores se extirparon y congelaron a -80 °C hasta el análisis.

En experimentos alternativos, el tratamiento se inició el día 8 después de la inoculación de las células tumorales cuando los ratones se aleatorizaron y asignaron a uno de los grupos tratado con MPL o con vehículo (5-6 ratones por grupo). El MPL se suspendió en hidroperoximetilcelulosa (0.5 % p/v HPMC), se esterilizó por sonicador y se administró cada dos días ya sea intraperitonealmente (i.p) u oralmente en forma de gavage (100 µL). En el primer ensayo piloto, el fármaco se administró i.p. a 2.5 o 25 mg/kg de peso corporal, tres veces por semana durante 2 semanas. Después del resultado, en el siguiente grupo de animales, la dosis se aumentó a 25 y 50 mg/kg, tres veces por semana. En el último (tercer) estudio piloto, los ratones se trataron oralmente. Las dosis administradas fueron de 50 y 100 mg/kg tres veces por semana. En todos estos ensayos, los ratones en los grupos control recibieron un volumen similar del vehículo (HPMC 0.5 %). La histología/inmunohistoquímica tumoral se realizó sobre lascas de tumores fijadas con formalina de acuerdo con el procedimiento estándar.

Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como la media $\pm$ el error estándar de la media (S.E.M.) de al menos dos experimentos independientes. Las diferencias en el volumen tumoral entre el grupo tratado con MPL respecto al grupo control se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Las variables cuantitativas se compararon mediante la prueba t de Student. Se definió una diferencia estadística significativa con $P < 0.05$.

Resultados

MPL inhibe la proliferación celular

El efecto de MPL se examinó sobre el crecimiento de las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3, A2780 y SKOV-3. Mediante la realización del ensayo SRB, se examinó el efecto de MPL sobre la proliferación celular. MPL inhibió la proliferación de las células OVCAR-3, A2780 y SKOV-3 en una manera dependiente de la concentración con valores de IC50 de 6.3, 10.0 y 29.3, respectivamente, de acuerdo con la Tabla 1. A partir de estos resultados, es evidente que las líneas celulares de cáncer de ovario son sensibles a los efectos antiproliferativos de MPL. Las células SKOV-3 fueron las menos sensibles. Además, de manera similar MPL-SO₂ se evaluó mediante la realización del ensayo de proliferación SRB. Se encontró que MPL-SO₂ es tan potente como MPL. MPL-SO₂ redujo la viabilidad de las líneas celulares de cáncer que crecen en cultivo e inhibió la proliferación celular. Los valores de IC50 para MPL-SO₂ se presentan en la Tabla 1.

El efecto inhibitorio de MPL sobre la proliferación celular se evaluó, además, en una diversidad de células, tales como células de mama, próstata y mesotelioma. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1. Otros resultados adicionales se presentan en la Tabla 2.

Tabla 1: Valores de IC50 para MPL y MPL-SO₂ (72 horas tratamiento in vitro, ensayo SRB)

Líneas celulares	Tipo de cáncer	IC50 (μM)	
		MPL	MPL-SO ₂
OVCAR-3	Cáncer de ovario	6.3	5.5
A2780	Cáncer de ovario	10.0	4.2
SKOV-3	Cáncer de ovario	29.3	26
IGROV-1	Cáncer de ovario	6.1	~
1A9	Cáncer de ovario	1.8	4.8
T47-D	Cáncer de mama	5.7	
MDA-MB-231	Cáncer de mama	24.0	23.6
MCF-7	Cáncer de mama		7.3
PET	Mesotelioma	26.3	
YOU	Mesotelioma	23.1	
PC-3	Cáncer de próstata	21.6	
DU-145	Cáncer de próstata	23.5	
U87	Glioblastoma	26.2	20.5
HUVEC	Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana	87.8	47.8
CHO	Ovario de Hámster Chino		73.7
HEK	Riñón Embrionario Humano	50.5	-

Tabla 2: Valores de IC50 para MPL y MPL-SO₂ en la supresión de la proliferación de diversas líneas celulares de cáncer.

Línea Celular	Tipo celular	IC ₅₀ (μM)	
		MPL	MPL-SO ₂
OVCAR-3	Cáncer de ovario	6.3 ± 0.8 ***	5.5 ± 1.3***
A2780	Cáncer de ovario	10 ± 3.8**	4.2 ± 2.1 **
SKOV-3	Cáncer de ovario	31.18 ± 0.76***	26
IGROV-1	Cáncer de ovario	4.4 ± 0.27**	4.4 ± 1.5**
1A9	Cáncer de ovario	2.5 ± 0.45**	3.42 ± 0.1**
T47-D	Cáncer de mama	5.3 ± 0.003**	10.2 ± 0.6**
MDA-MB-231	Cáncer de mama	23.8 ± 0.2**	21.6 ± 7.5***
MCF-7	Cáncer de mama	15.4 ± 1.1**	8.0 ± 0.7**
PET	Mesotelioma	26	-
YOU	Mesotelioma	23	-
PC-3	Cáncer de próstata	21	-
DU-145	Cáncer de próstata	23	-
SW-876	Liposarcoma	14.57	
HT-1080	Fibrosarcoma	17.16	-
U87	Glioma	18 ± 7.1**	20.5 ± 1.0**
LN-18	Glioma	9.38 ± 0.79**	6.64 ± 0.71**
T98G	Glioma	18.2 ± 0.61	25.4 ± 0.28**
U251	Glioma	17 ± 1.2**	-
HCT-116	Cáncer colorrectal	10.5 ± 0.02**	22.5 ± 5.7**
HT-29	Cáncer colorrectal	5.86 ± 0.2**	2.75 ± 0.7**
HT-29 5m 11	Cáncer colorrectal	10.4	21.7
HeLa	Epitelial (Adenocarcinoma)	15.8 ± 0.3**	18.2 ± 2.6**
HUVEC	Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana	87	47
CHO	Ovario de Hámster Chino	34.61 ± 0.789***	73.7 ± 6.0 **
HEK	Riñón Embrionario Humano	34.57 ± 0.86**	-
3T3	Fibroblasto	12.41 ± 0.37**	11.2 ± 1.1**
HaCat	Queratinocitos	21.2 ± 3.2**	42.68 ± 8.0**
Astrocitos Fetales Humanos	Astrocitos	85.55 ± 2.7**	-

Sin asterisco = una determinación, ** = dos repeticiones, *** = tres repeticiones

Tabla 3:

	ALA	AHC #	PM	Fórmula	IC ₅₀ μ M	IC ₅₀ μ M	IC ₅₀ μ M	IC ₅₀ μ M
D					OVCAR-3	A2780	CHO	HUVEC
1	450	0942648	382.77	C18H14C1F3N2O2	23.85 $\pm$ 1.45	33.5 $\pm$ 8.5	45.87	96.5
2	907	2000020	416.32	C19H14N2O2F6	18.9 $\pm$ 4.1	27.65 $\pm$ 7.15	169	55.18
3	970	2000114	432.32	C19H14N2O3F6	>100	>100	142	139.8
4	1154	2001354	433.21	C18H13N2O3F3C12	20.5 $\pm$ 0.5	28.0 $\pm$ 4.5	34.8	61.1
5	1336	2017686	479.20	C18H12N2O3F5Br	14.65 $\pm$ 1.25	17.0 $\pm$ 1.2	31.8	61.3
6	1470	2033757	468.30	C19H12N2O3F8	12.9 $\pm$ 0.3	19.5 $\pm$ 4.1	32.2	74.0
7	004	2060021	416.75	C18H13N2O3F4C1.	18.58 $\pm$ 2.4	27.3 $\pm$ 0.5	57.3	93.0
8	2009	2062412	416.75	C18H13N2O3F4C1	34.3 $\pm$ 4.3	75.9 $\pm$ 1.9	198	129.9
MPL (S)	1566	2082782	473.39	C20H13N3O2F6S	7.9 $\pm$ 0.9	11.3 $\pm$ 0.9	34.61	65.0
MPL (R)	2224	2102224	473.39	C20H13N3O2F6S	8.0 $\pm$ 0.7	14.75 $\pm$ 0.45	23.4	108.8

OVCAR-3, A2780 son células epiteliales humanas de cáncer de ovario; CHO = Células de Ovario de Hámster Chino; HUVEC = Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana

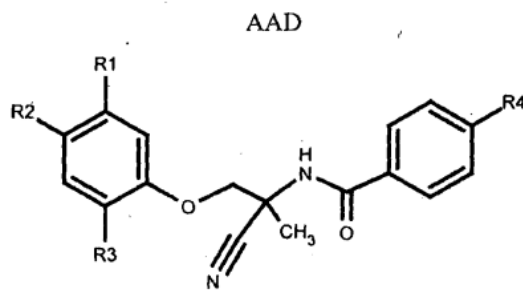


Tabla 4: Derivados de aminoacetonitrilo (AAD) de acuerdo con la Tabla 3

AAD	R1	R2	R3	R4
1566 (MPL)	CN	H	CF ₃	SCF ₃
2105 (MPL-SO)	CN	H	CF ₃	SO CF ₃
4670 (MPL-SO ₂)	CN	H	CF ₃	SO CF ₃
450	H	H	Cl	CF ₃
907	H	H	CF ₃	CF ₃
970	H	H	CF ₃	OCF ₃
1154	Cl	H	Cl	OCF ₃
004	F	H	Cl	OCF ₃
2009	H	F	Cl	OCF ₃
1336	F	F	Br	OCF ₃
1470	F	F	CF ₃	OCF ₃

De acuerdo con la Tabla 3, "MPL-(R)" se refiere a N-[(1R)-1-ciano-2-(5-ciano-2- trifluorometil-fenoxi)-1 -metil-etil]-4-trifluorometilsulfanil-benzamida, y "MPL-(S)" se refiere a N-[(1S)-1-ciano-2-(5-ciano-2-trifluorometil-fenoxi)-1-metil-etil]-4-trifluorometilsulfanil-benzamida.

De acuerdo con los resultados que se muestran en la Tabla 3, la relación del valor de IC₅₀ (célula normal/célula cancerosa) para AAD 907, 1336, 1470 y 2224 (MPL-(R)) muestran una actividad particularmente alta. Además, AAD 2224 (MPL-(R)) y AAD 1566 (MPL-(S)) se encontró que eran equipotentes. Es notable que el enantiómero (R), MPL-(R) se demostró previamente que no tiene actividad antihelmíntica.

En resumen, MPL y MPL-SO₂ se evaluaron in vitro contra una amplia diversidad de líneas celulares de cáncer con características de enfermedad ampliamente diferentes. Para estudios más detallados, se eligieron las líneas celulares de cáncer de ovario humano OVCAR-3 y A2780. Adicionalmente, se cultivaron células epiteliales de superficie ovárica humana normal (HOSE) y se cultivaron en presencia de MPL (0, 5, 10, 25, 50 y 100 μ M) durante 72 horas. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de azul de Tripán (Figura 9). De la misma manera, se investigó el efecto de MPL sobre el crecimiento de células epiteliales, endoteliales, embrionarias y fetales normales (Figura 10), mientras que la proliferación celular se evaluó mediante el ensayo SRB (Figura 11). Se tomaron células control (tratadas con vehículo) para presentar el 100 % de la proliferación y los grupos tratados con MPL se expresaron como el porcentaje de control $\pm$ SEM. Cada concentración del fármaco se evaluó en cuadruplicado y cada experimento se repitió al menos dos veces. Para las comparaciones estadísticas, cada grupo tratado con el fármaco se comparó con el grupo control mediante la prueba t de Student. Para examinar el efecto del fármaco en dependencia de la concentración, se usó el análisis de varianza (ANOVA). Los valores de P son: * = < 0.05; ** < 0.01 y *** = < 0.001, **** p < 0.0001. Los resultados presentados en la Tabla 2 revelan que MPL ejerce una actividad antiproliferativa elevada en las líneas celulares de cáncer, mientras que las células normales son mucho menos afectadas. Para determinar si el efecto de MPL se produce a través del receptor nicotínico acetil colina y en particular el subtipo nAChR7, las células fueron pretratadas con antagonistas y después se expusieron a MPL (Figura 12).

Además se presentan los resultados obtenidos para MPL-S02. Puede observarse que MPL-S02 actúa en un orden similar al fármaco parental MPL. El intervalo de los valores IC₅₀ son muy cercanos y sugieren que MPL-S02 es tan eficaz como MPL en la supresión de la proliferación de células cancerosas (Tabla 2).

5 MPL inhibe la formación de colonias

Para investigar si MPL, además, impide la integridad reproductiva y la capacidad de las líneas celulares de establecer colonias, se investigó la actividad clonogénica de las células expuestas a MPL. Después de 72 horas de exposición a diversas concentraciones de MPL, las células se lavaron y después se incubaron en medio libre de fármaco durante 2 semanas. Se encontró que MPL impide profundamente la formación de colonias por estas células. Las concentraciones más altas de MPL condujeron a una pérdida casi completa de la capacidad clonogénica (Figura 2).

Para determinar el efecto de MPL sobre la integridad celular y la capacidad para liberarse de los efectos de los fármacos después de la exposición y la retirada del fármaco, las células se incubaron con MPL (0, 5, 10, 25 mM) durante 72 horas, se lavaron con PBS, se transfirieron a placas de agar, se cultivaron en medio de crecimiento y se incubaron bajo condiciones estándar durante 2 semanas. Después las células se fijaron con metanol al 100 % y se tiñeron con violeta cristal al 1 %. Las colonias (conglomerado de células mayores de 50) se contaron bajo microscopio (aumento 5 x). El número de colonias contadas para los diferentes grupos experimentales se expresa como porcentaje del control (Figura 15). Estos resultados demuestran inhibición de la formación de colonias por MPL dependiente de la concentración.

MPL detiene el ciclo celular a través de la regulación negativa de la expresión de ciclinas y de quinasas dependientes de ciclina.

Para investigar el mecanismo(s) a través del cual MPL inhibe la proliferación celular y la formación de colonias, se examinó el efecto de MPL sobre el ciclo celular por medio de citometría de flujo. Se encontró que MPL interfiere con la progresión del ciclo celular (Figura 3). La progresión de las células expuestas a MPL se detuvo en la fase G1 en una manera dependiente de la concentración y del tiempo. La acumulación de las células en la fase G1 se acompañó de una disminución marcada del porcentaje de las células en las fases S y G2-M. Para estudiar los mecanismos moleculares implicados en la detención del ciclo celular inducida por MPL, se examinó la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular cdk2, cdk4, ciclinas A y E. Las células tratadas con MPL expresaron niveles más bajos de cdk2, cdk4, ciclinas A y E (Figura 4).

MPL detiene el ciclo celular a través de la regulación negativa de la expresión de ciclinas y quinasas dependientes de ciclina lo que conduce a la inducción de la escisión de PARP-1.

Para encontrar el mecanismo(s) a través del que MPL inhibe la proliferación celular y la formación de colonias, el efecto de MPL en el ciclo celular se examinó por medio de citometría de flujo (FACS). Se encontró que MPL interfiere con la progresión del ciclo celular (Figura 22). En las células expuestas a MPL el ciclo celular se detuvo en la fase G1 en una manera dependiente de la concentración y del tiempo. La acumulación de las células en la fase G1 se acompañó de una disminución marcada del porcentaje de las células en las fases S y G2-M. Para estudiar los mecanismos moleculares implicados en la detención del ciclo celular inducida por MPL, se examinó la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular cdk2, cdk4, ciclinas A y E. Las células tratadas con MPL expresaron niveles más bajos de cdk2, cdk4, ciclina E y ciclina A (Figuras 4 y 16).

45 MPL induce la escisión de PARP-1

Para investigar si la muerte celular inducida por MPL implica la escisión de PARP, se realizó un análisis de inmunoelectrotransferencia por Western de los extractos celulares de las células tratadas con MPL para PARP-1 y PARP-1 escindido. La escisión de PARP-1 promueve la apoptosis mediante la prevención de la supervivencia que induce la reparación del DNA. PARP contribuye a mantener la viabilidad celular y por tanto, la escisión de PARP facilita el desensamblaje celular y sirve como marcador de células sometidas a apoptosis. La Figura 5 muestra que PARP se escindió en células tratadas con MPL.

55 MPL induce la escisión de PARP

El análisis de la inmunoelectrotransferencia por Western de los extractos celulares preparados a partir de células OVCAR-3 y A2780 tratadas con MPL muestra una escisión altamente inducida de PARP que representa la muerte celular (Figura 18).

60 MPL reduce los niveles de ATP celular

Como se representa en las Figuras 19A y 19B, el tratamiento de las células OVCAR-3 o A2780 con MPL provoca una reducción en los niveles de ATP encontrados en la célula.

65 MPL induce autofagia

La Figura 6 muestra que el tratamiento de las células con MPL conduce a la formación de vacuolas, lo que sugiere que MPL puede inducir autofagia en estas células. La Figura 7 muestra que el tratamiento con MPL reduce la relación celular de ADP/ATP, lo que es otro indicador de autofagia celular.

5 MPL suprime la tasa de crecimiento de los xenoinjertos s.c. en ratones desnudos

10 Las Figuras 20-22 muestran ensayos in vivo de MPL en ratones desnudos. Los ratones que portan tumores de OVCAR-3 se trataron ya sea primero por vía i.p. o, de acuerdo con el último experimento, por vía oral. Los resultados obtenidos revelan la actividad de las dosis administradas y en particular la dosis de 50 mg/kg (tanto por vía i.p. como oral) en el retardo marcado del crecimiento tumoral en estos animales. La histología tumoral reveló áreas extensas de muerte de células tumorales (Figura 23).

15 La inhibición de la proliferación celular junto con la supresión de la formación de colonias, y los resultados in vivo muestran un efecto regulador del crecimiento para MPL. La interferencia de MPL se mostró con la progresión del ciclo celular a través de la reducción de la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular A y E2 junto con sus quinasas cdk2 y cdk4. En la célula normal, la transición de una fase a otra ocurre de manera ordenada y bien regulada por varias proteínas. Las quinasas dependientes de ciclina (CDK) son las proteínas reguladoras clave que se activan en puntos específicos del ciclo celular, por tanto tienen un papel crucial en la progresión del ciclo celular. Estas requieren diferentes ciclinas en diferentes fases del ciclo. Las ciclinas A, D y E son necesarias para la fase G1 y para la transición de G1 a la fase S del ciclo celular. De los diversas CDK identificadas hasta el momento, CDK2 y CDK4 parecen esenciales para la entrada en G1 y para la transición de G1-S. Las ciclinas A y E se unen a CDK2 mientras que la ciclina D se une a CDK4 y CDK6. El cáncer es una de las diversas enfermedades considerada como un fenómeno relacionado con el ciclo celular.

25 Los resultados presentados en las Figuras 20-22 demuestran la actividad de MPL en la supresión del crecimiento de los tumores s.c. en ratones desnudos femeninos. El ensayo inicial reveló una actividad dependiente de la dosis de administración i.p. de MPL. La dosis de 25 mg/kg fue particularmente eficaz. Sobre esta base, el ensayo siguiente se realizó mediante el uso de las dosis de 25 y 50 mg/kg bajo las mismas condiciones que antes. La dosis de 50 mg/kg fue más eficaz en retardar el crecimiento tumoral en estos animales. Como un agente antiparasitario, se ha mostrado que MPL es oralmente efectivo en una serie de modelos animales. Se evaluó la actividad terapéutica oral de las dosis de 50 y 100 mg/kg de MPL. En los tres ensayos piloto, MPL se preparó en HPMC al 0.5 % y se administró como una suspensión. El examen del tejido tumoral de estos estudios in vivo reveló áreas con necrosis extensa en los tumores tratados con MPL (Figura 23).

35 Como se muestra en las Tablas 1 y 2, los efectos observados no se limitan al cáncer de ovario, y MPL suprime eficazmente la proliferación celular in vitro en una variedad de líneas celulares que representan diversos cánceres que incluye glioma, próstata, mama, mesotelioma, liposarcoma, fibrosarcoma (Ver Tablas 1 y 2).

40 Otra observación importante es la actividad de MPL contra las líneas celulares resistentes a la quimioterapia. Las células de ovario resistentes a la quimioterapia, las células de glioma resistentes a temozolimida y las células de cáncer de mama resistentes al tamoxifeno son sensibles a la acción antiproliferativa de MPL.

En conclusión, los resultados demuestran que en las líneas celulares de cáncer, MPL y potencialmente sus metabolitos y análogos (AAD):

- 45 1- Inhibe la proliferación celular;
- 2- La inhibición que induce MPL no se afecta ni positiva ni negativamente por el pretratamiento con agonistas o antagonistas nicotínicos, lo que indican que el modo de acción no es mediado por el receptor de nicotina;
- 2- Inhibe la formación de colonias;
- 3- Detiene el ciclo celular [fase G1];
- 50 4- Regula negativamente las proteínas reguladoras del ciclo celular (Cdk2, Cdk4, ciclina A, ciclina E);
- 5- Bloquea la incorporación de timidina en la célula, por tanto inhibe la síntesis de DNA;
- 6- Reduce los niveles celulares de ATP;
- 7- Causa autofagia progresiva como se confirma por la conversión de LC3B-I en LC3B-II;
- 8- La autofagia fue microscópicamente clara tanto en las líneas celulares de cáncer de ovario como de glioma;
- 55 9- MPL induce, además, la escisión de PARP-1 y por tanto la muerte celular;
- 10- Esto se confirma por los datos in vivo que muestran la supresión dosis dependiente de tumores en ratones desnudos que portan tumores s.c.;
- 11- Las vías de administración i.p. y oral son eficaces.

60 Además, MPL inhibe la proliferación de células resistentes a alguna quimioterapia estándar.

mTOR y autofagia

65 Otro aspecto de la presente solicitud es el papel de la autofagia en el cáncer y en las enfermedades neurodegenerativas. En células neuronales con apoptosis anormalmente rápida que causa neurodegeneración, la autofagia sirve como un mecanismo para proteger a las neuronas de la muerte celular acelerada.

La autofagia, o autodigestión celular, es una vía celular implicada en la degradación de proteínas y organelos, con un sorprendente número de conexiones a enfermedades humanas y a la fisiología. Por ejemplo, la disfunción autofágica se asocia con cáncer, neurodegeneración, infección microbiana y envejecimiento. Paradójicamente, aunque la autofagia es principalmente un proceso protector para la célula, puede, además, jugar un papel en la muerte celular en las células cancerosas.

mTOR es un eje regulador negativo importante de la autofagia. Los inhibidores directos de mTOR y aquellos inhibidores de las vías que activa mTOR, subsecuentemente inducen autofagia. La quinasa mTOR responde a factores de crecimiento y a los niveles de nutrientes para regular el crecimiento celular y la autofagia. La inhibición de mTOR causa autofagia. La autofagia protege a las células del daño que conduce a la neurodegeneración.

La autofagia, vía principal de la degradación de organelos y de proteínas de larga vida, es esencial para la supervivencia de las neuronas. Evidencias crecientes asocian la autofagia defectuosa con la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas importantes, particularmente la enfermedad de Alzheimer (AD). Los hallazgos de los estudios revisados sugieren que la autofagia se altera en la etapa temprana de la enfermedad, y la disfunción en la autofagia puede jugar un papel importante en el proceso patológico de la AD.

La autofagia protege a las células del daño que conduce a la neurodegeneración.

mTOR/Autofagia en enfermedades neurodegenerativas

Enfermedad de Alzheimer

Se cree que la acumulación de Abeta y tau son la causa directa o que contribuyen al déficit cognitivo progresivo característico de la enfermedad de Alzheimer. Se ha demostrado que mTOR puede desempeñar un papel en la neurodegeneración inducida por Abeta y tau.

La vía mTOR juega un papel central en el control de la homeostasis de las proteínas y, por tanto, en las funciones neuronales. En efecto, la señalización de mTOR regula diferentes formas de aprendizaje y memoria. La rapamicina recupera el déficit cognitivo y mejora la patología de Abeta y Tau mediante el aumento de la autofagia. De manera similar, diversos componentes de la señalización de mTOR pueden ser biomarcadores potenciales del deterioro cognitivo en el diagnóstico clínico de la AD. Por tanto, a través del control de la degradación de proteínas por autofagia lisosomal, se anticipa que los agentes relacionados con mTOR (tales como MPL) son agentes terapéuticos importantes para la AD.

Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington es uno de los nueve trastornos neurodegenerativos hereditarios causados por una expansión del tracto poliglutamínico. Las proteínas de poliglutamina expandida se acumulan anormalmente en agregados intracelulares. En modelos celulares, ratones transgénicos y cerebros humanos, se muestra que mTOR está secuestrado en los agregados de poliglutamina. El secuestro de mTOR impide su actividad quinasa e induce autofagia, una vía clave de eliminación de los fragmentos de huntingtina mutada. Esto protege contra la toxicidad de la poliglutamina, ya que el inhibidor específico de mTOR, rapamicina, atenúa la acumulación de huntingtina y la muerte celular en los modelos celulares de la enfermedad de Huntington, y la inhibición de la autofagia tiene efectos contrarios.

Además, mTOR se implica en la inflamación, inmunosupresión y enfermedades neurodegenerativas.

La actividad de MPL sobre la vía inflamatoria NF- κ B y sus dianas descendentes

El factor de transcripción NF- κ B ha sido de interés para la respuesta mediada por la inflamación, principalmente porque diversos mediadores y citoquinas causan la activación de este factor de transcripción. Además, la activación de la familia de transcripción NF- κ B desempeña un papel central en la inflamación a través de su capacidad para inducir la transcripción de genes proinflamatorios. La relación entre la activación de NF- κ B y la inflamación se ha demostrado en varias enfermedades humanas y en modelos animales de enfermedad. Además, el papel de NF- κ B como mediador de la inflamación se ha establecido mediante el uso de enfoques genéticos o con inhibidores químicos.

NF- κ B se encuentra en el citoplasma como una forma inactiva unida a la proteína inhibidora I κ B α . Cuando se estimula mediante señales extracelulares apropiadas, I κ B α se fosforila por IKK, lo que resulta en la degradación de I κ B α mediada por proteosoma. Después, el complejo activo de NF- κ B se libera y se desplaza al núcleo para mediar la transcripción de sus genes diana. El complejo IKK se activa ya sea por autofosforilación o por fosforilación mediada por una serie de quinasas activadas por mitógeno (MAP3K) en respuesta a estímulos divergentes tales como lipopolisacáridos (LPS), IL-1 β , factor de necrosis tumoral (TNF)- α y TGF- β .

Las Figuras 27 a 32 muestran la influencia de MPL sobre las vías de transducción de señales de NF- κ B. Las células RAW264.7 de macrófagos estimuladas con LPS se usaron como un sistema modelo in vitro para la inflamación.

Se observó que MPL disminuyó la activación de NF- κ B en estas células según se evaluó por inmunocitoquímica y análisis de inmunoelectrotransferencia por Western. Este efecto podría confirmarse mediante la inhibición de la fosforilación y del desplazamiento nuclear de NF- κ B p65 y, además, por la inhibición de la fosforilación de IKK e I κ B α . El efecto inhibitorio de MPL se observó, además, en la expresión de IL-6, TGF- β y también óxido nítrico (NO), que todos son mediadores inflamatorios regulados por NF- κ B.

Los resultados muestran que MPL inhibe los mecanismos celulares, que son importantes en reducir la inflamación y que MPL afecta vías patológicas importantes que no se relacionan con el cáncer.

Los resultados muestran claramente que MPL inhibe los mecanismos celulares, que son importantes en una respuesta a la inflamación y que MPL afecta vías patológicas importantes que no se relacionan con el cáncer.

Discusión

mTOR, la diana de rapamicina en células de mamíferos, fue nombrado basado en el precedente de que TOR se descubre por primera vez a través de estudios genéticos y moleculares de los mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* resistentes a rapamicina, que identificaron a FKBP12, Tor1 y Tor2 como las diana de rapamicina y proporcionó un sustento robusto acerca de que el complejo FKBP12-rapamicina se une a, e inhibe las funciones celulares de Tor1 y Tor2.

La rapamicina detiene la actividad fúngica en la fase G1 del ciclo celular. En ratas, esta suprime el sistema inmune mediante el bloqueo de la transición de la fase G1 a S en linfocitos T. En humanos, esta se usa como un inmunosupresor después del trasplante de órganos. mTOR integra la entrada de las vías ascendentes, que incluye insulina, factores de crecimiento (tales como IGF-I e IGF-2) y aminoácidos. Además, mTOR detecta nutrientes celulares, oxígeno y niveles de energía. La vía mTOR se desregula en las enfermedades humanas, tales como la diabetes, la obesidad, la depresión y ciertos cánceres. La rapamicina es un producto bacteriano que puede inhibir mTOR mediante la asociación con su receptor intracelular FKBP12. El complejo FKBP12-rapamicina se une directamente al dominio de unión FKBP12-rapamicina (FRB) de mTOR, e inhibe su actividad.

Aunque la vía mTOR se ha identificado como un elemento importante en muchas enfermedades que incluyen el cáncer, hasta la fecha sólo la rapamicina tiene un uso clínico extensivo, y a pesar de su lanzamiento al mercado en los años 90, los nuevos productos de mTOR tienen un uso clínico limitado. De manera similar, a pesar de la capacidad de la rapamicina de interferir con la vía mTOR, sólo se usa para el tratamiento del rechazo de órganos. La presente invención identifica una nueva clase de inhibidores de mTOR distintos de la rapamicina, que se dirigen a diferentes componentes de la vía mTOR, lo que abre opciones de tratamiento más amplias para un grupo de enfermedades importantes.

Como se muestra en la Tabla 1, MPL se evaluó, además, en HUVEC. Se encontró que el valor de IC50 es aproximadamente 10 veces más alto que el valor de IC50 en OVCAR-3, lo que refleja la mayor potencia citotóxica de MPL en células cancerosas respecto a células no cancerosas.

En los ensayos de formación de colonias, el MPL suprimió la formación de colonias de la línea de células de cáncer de ovario que crece en placas de agar, en una manera dependiente de la concentración y por tanto, demuestra, además, la eficacia de MPL para inhibir el crecimiento de células cancerosas.

Además, demostró que independientemente del estado de p53 de las células [OVCAR-3 (mutada), SKOV-3 (nula) y A2780 (tipo salvaje)], MPL ejerce sus efectos anticancerígenos (aunque a diferentes potencias). Esto sugiere que MPL sería eficaz en los cánceres de ovario epiteliales, independientemente del estado de p53 en el tumor. Este hallazgo puede ser de importancia ya que la mutación p53 es muy común en una diversidad amplia de cánceres.

Debe entenderse que los efectos mostrados por MPL pueden extenderse a otros tipos de cánceres además del cáncer de ovario.

El ciclo celular de los mamíferos se rige por la activación secuencial de las Cdk. La progresión a través de la fase G1 y la entrada en la fase S se regula por Cdk2 en forma de complejo con la ciclina A y la ciclina E. Por tanto, la supresión de la expresión de estas proteínas reguladoras interrumpe el progreso del ciclo celular.

La inhibición de la proliferación celular y de la formación de colonias depende de la concentración de MPL. Un mecanismo posible por el cual MPL interrumpe la progresión del ciclo celular es la regulación negativa de las proteínas reguladoras del ciclo celular E y A y las quinasas dependientes de ciclina Cdk4 y Cdk2, lo que causa la detención en G1. Como resultado de la detención en G1, las células no progresan a la siguiente etapa del ciclo, como se evidenció por una reducción dramática en el tiempo de las células en las fases S y G2-M. El porcentaje de células en la fase G2-M del grupo tratado con vehículo fue más de tres veces mayor que en el grupo tratado con MPL 25 μ M.

Además, la evidencia de autofagia en las líneas celulares de cáncer tratadas con MPL sugiere fuertemente que las células salen, irreversiblemente, del ciclo celular a través de la detención en la fase G0 del ciclo celular.

Discusión adicional

- Las evidencias acumuladas apoyan la hipótesis de que mTOR actúa como un "interruptor principal" del catabolismo y el anabolismo celular, mediante las señales que dirige a las células para que se expandan, crezcan y proliferen. Aunque este se encuentra en prácticamente todas las células de mamíferos, es particularmente importante en las células tumorales que proliferan e invaden agresivamente.
- Los tratamientos dirigidos contra las vías de señalización celular demostraron ser prometedores en el manejo de tumores sólidos y neoplasias malignas hematológicas. Se demostró que mTOR es una quinasa clave que actúa en la vía descendente que sigue la activación del fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K).
- Actualmente los agentes que inhiben específicamente a mTOR se desarrollan como posibles fármacos antitumorales.
- Los agentes inhibidores de mTOR esencialmente interrumpen la progresión del ciclo celular a través de la inducción de la detención en la fase G1. La rapamicina es el inhibidor prototipo de mTOR.
- La biología de mTOR ha proporcionado ideas sobre el papel de mTOR en diversos cánceres. El mTOR activo coordina una respuesta en el crecimiento celular directamente a través de sus efectos sobre los reguladores del ciclo celular e indirectamente mediante el mantenimiento del suministro de nutrientes en la célula a través de la producción de transportadores de nutrientes y, además, a través de la promoción de la angiogénesis. Una vía principal por la que mTOR ejerce sus efectos reguladores sobre la proliferación celular es mediante el control de la producción de la ciclina D1. mTOR proporciona el soporte adecuado de nutrientes para sustentar el crecimiento y la proliferación anormales de las células. Dado que la vía de mTOR se desregula en un número de cánceres, se espera que los inhibidores de mTOR ejerzan amplios efectos terapéuticos contra el cáncer.
- Para monitorear los efectos biológicos de los inhibidores de mTOR, tales como los derivados de rapamicina y reducir las dosis biológicamente activas en pacientes, pueden usarse marcadores moleculares sustitutos. Estos pueden incluir la expresión de ciclina D1, ciclina E, la fosforilación de P70S6K o la expresión de caspasa 3 y c-Myc. La ciclina D1 es un protooncogén cuya amplificación genética y sobreexpresión de proteína se observan frecuentemente en células tumorales. La ciclina D1 induce la progresión del ciclo celular de G1 a S.
- Se ha demostrado que MPL detiene la progresión del ciclo celular en la fase G1. Los datos se presentan en la presente descripción a partir de ratones portadores de tumores tratados con MPL que muestran una marcada regulación negativa de la ciclina D1. Además, la expresión tumoral de la ciclina E, otro intermediario importante de la vía de señalización de mTOR y de la progresión del ciclo celular, se suprime, además, en los tumores tratados con MPL. Las ciclinas D y E, conocidas como ciclinas G1, se unen a CDK4 y CDK2 respectivamente y facilitan la transición de la fase G1 a S. La pérdida de ciclina D1 en células de cáncer de ovario es suficiente para inducir la detención del ciclo celular en G1 y esta estrategia no se impide por la presencia de ciclina E2. Incluso, se sugiere que la ciclina D1 es una diana terapéutica suficiente en las células de cáncer de ovario. Está bien establecido que c-Myc afecta al ciclo celular en múltiples puntos que incluyen las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 las que se unen a la ciclina D1 y reducen la magnitud de la activación de ciclina E-Cdk2.
- La expresión desregulada del protooncogén c-Myc se produce en una amplia diversidad de cánceres humanos y con frecuencia se asocia con mal pronóstico, lo que indica para este oncogén un papel clave en la progresión tumoral a través del factor de transcripción que regula la proliferación celular, el crecimiento y la apoptosis. La expresión o función desregulada de c-Myc es una de las anomalías más comunes en la malignidad humana. En la presente descripción se revela que MPL actúa sobre ambos mediadores del tránsito del ciclo celular (G1 a S), es decir, la ciclina D1 y c-Myc.
- La quinasa mTOR controla la maquinaria de traducción, en respuesta a aminoácidos y factores de crecimiento, a través de la activación de la quinasa ribosomal S6 p70 (p70S6K) y de la inhibición de la proteína de unión eIF-4E (4E-BP1).
- Como un efector importante de la vía descendente de mTOR, S6K se implica en varios procesos celulares, que incluyen la transcripción y traducción de proteínas, los que median el crecimiento celular y el metabolismo. Sobre esta base, el mTOR-S6K presenta un eje crítico para la traducción de señales específicas (factores de crecimiento, nutrientes y hormonas) en la respuesta celular. Además, la fosforilación de p70 por mTOR es crítica para la biogénesis de ribosomas.
- Los resultados mostrados en las Figuras 9 a 11 demuestran que se inhibe la activación de mTOR, inducida por MPL, lo que conduce a la regulación negativa de p-mTOR, c-Myc [oncogén], ciclina D1, ciclina E2, quinasas dependientes de ciclinas 2 y 4 [esenciales para la progresión del ciclo celular] y p- P70S6K.
- En resumen, la presente invención muestra que MPL produce autofagia a través de la vía mTOR y especialmente inhibe p-P70S6K (Thr 389) que es una parte de la vía de señalización descendente de mTOR conocida por regular la angiogénesis y la autofagia.

La presente descripción muestra, además, que MPL inhibe la ciclina D1 la que es necesaria para la progresión del ciclo celular y se expresa en exceso en muchos cánceres graves. Otros demostraron que la regulación negativa de P70S6K inhibe la fosforilación y por tanto, la actividad de la ciclina D1, lo que coincide con los hallazgos de la presente descripción.

5

Además, P70S6K regula a PDCD4, la quinasa de adhesión focal, la E caderina, la B catenina y el transglutominato 2 tisular, los que son importantes en metástasis e invasión.

10

El efecto de MPL/autofagia de acuerdo con la presente descripción muestra que MPL y los AAD similares son útiles en el tratamiento de enfermedades donde la autofagia es deficiente, tales como infarto cerebral, enfermedades neurodegenerativas, deficiencia de $\alpha 1$ antitripsina, trastornos de almacenamiento lisosomal, cardiomiopatías, trastornos inmunes y enfermedades autoinmunes, infecciones bacterianas y virales, parásitos, trastornos de los lípidos e incluso el envejecimiento. Otros ejemplos incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, enfermedades relacionadas con la edad, enfermedades relacionadas con el rechazo de trasplantes, enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades relacionadas con el almacenamiento de glucógeno, metástasis, lupus sistémico, enfermedades relacionadas con la inflamación y la activación inmune, anemia, leucopenia, trombocitopenia, enfermedades relacionados con el recubrimiento de endoprótesis, insuficiencia renal, obesidad, diabetes/resistencia a la insulina, enfermedades relacionadas con hígado graso no alcohólico, riñón poliquístico, enfermedad de Parkinson y fibrosis.

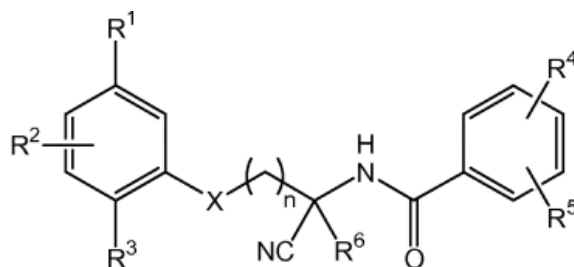
15

20

La presente invención demuestra claramente que MPL produce autofagia (a través de la vía mTOR) y por tanto esta puede ser una terapia útil y diferente para el cáncer.

Reivindicaciones

1. Un compuesto de la Fórmula (I):



(I)

o una sal aceptable farmacéuticamente, o solvato de este, para usar en el tratamiento de una o más enfermedades relacionadas con la vía de mTOR, en donde la una, o más enfermedades relacionadas con la vía de mTOR se seleccionan de enfermedades neurodegenerativas, enfermedades relacionadas con la edad, enfermedades relacionadas con el rechazo de trasplante, enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades relacionadas con el almacenamiento de glucógeno, lupus sistémico, enfermedades relacionadas con la inflamación y la activación inmune, anemia, leucopenia, trombocitopenia, enfermedades relacionadas con el recubrimiento de endoprótesis, insuficiencia renal, obesidad, diabetes/resistencia a la insulina, enfermedades relacionadas con el hígado graso no alcohólico, riñón poliquístico y fibrosis y en donde,

R¹ es -CN;

R² y R³ y R⁵ cada uno se selecciona independientemente de H, alquilo, halógeno, -CF₃ o -CN;

R⁴ y R⁶ cada uno se selecciona independientemente de H, alquilo, halógeno, alcoxi, -CF₃, -OCF₃, -SO₂CF₃, -SO₂CF₃ o -SCF₃;

X es un heteroátomo, N(alquilo) o NH; y

n es de 1 a 20.

2. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1 para usar en un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 1, en donde,

R² es H o halógeno;

R³ es -CF₃ o halógeno;

R⁴ es -SCF₃, -SO₂CF₃, -SO₂CF₃, -OCF₃, o -CF₃;

R⁵ es H;

R⁶ es alquilo;

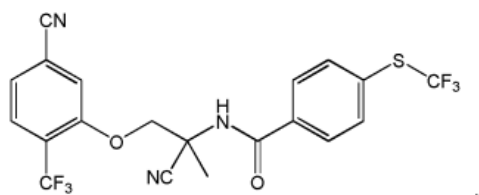
X es O; y n es 1 a 5.

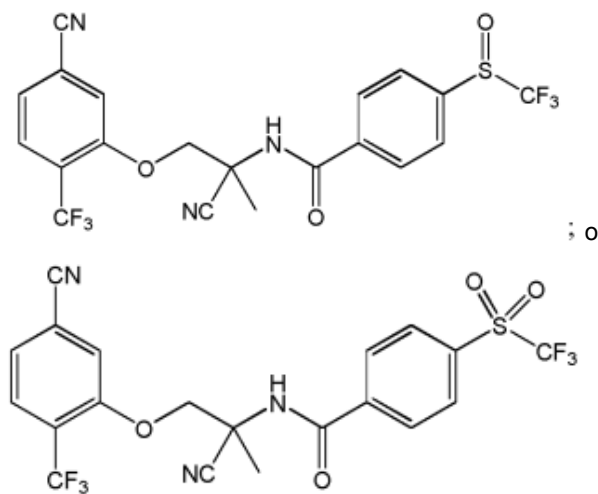
3. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1 o 2, para usar en un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 1, en donde R⁴ es para a la mitad amida.

4. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para usar en un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 1, en donde el compuesto de fórmula (I) es el enantiómero (R) o (S) o el racemato.

5. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para usar en un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 1, en donde el compuesto de fórmula (I) es el enantiómero (S).

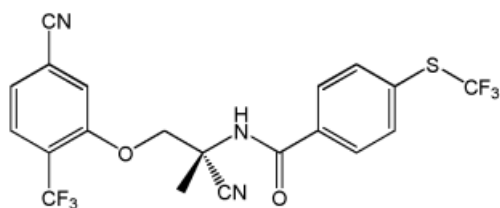
6. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para usar en un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 1, en donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona a partir de cualquiera de los siguientes compuestos:





en donde cada uno de los compuestos anteriores es el enantiómero (R) o (S) o el racemato, o una sal aceptable farmacéuticamente, o solvato de este.

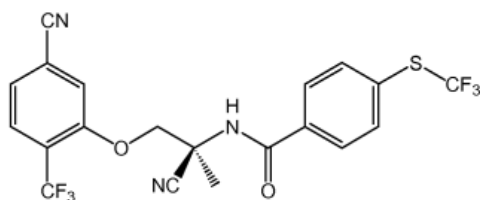
7. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, para usar en un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 1, en donde el compuesto de fórmula (I) es:



AAD 2224 (MPL-(R));

o una sal aceptable farmacéuticamente, o solvato de este.

8. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para usar en un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 1, en donde el compuesto de fórmula (I) es MPL (N-[(1S)-1-ciano-2-(5-ciano-2-trifluorometil-fenoxi)-1-metil-etil]-4-trifluorometilsulfanil-benzamida):



MPL

o una sal aceptable farmacéuticamente, o solvato de este.

9. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para usar en un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 1, en donde la una, o más enfermedades relacionadas con la vía de mTOR es una enfermedad inflamatoria crónica.

10. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para usar en un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 9 en donde la enfermedad inflamatoria crónica es la artritis reumatoide o el rechazo de un órgano después del trasplante.

11. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para usar en un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 1 en donde la fibrosis es fibrosis del hígado, fibrosis cardiaca o fibrosis pulmonar.
- 5 12. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para usar en un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 1 en donde la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington o la enfermedad de Parkinson.
- 10 13. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para usar en un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 12 donde la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson.
- 15 14. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para usar en un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 12 donde la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Huntington.
- 20 15. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para usar en un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 12 donde la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

Figura 1

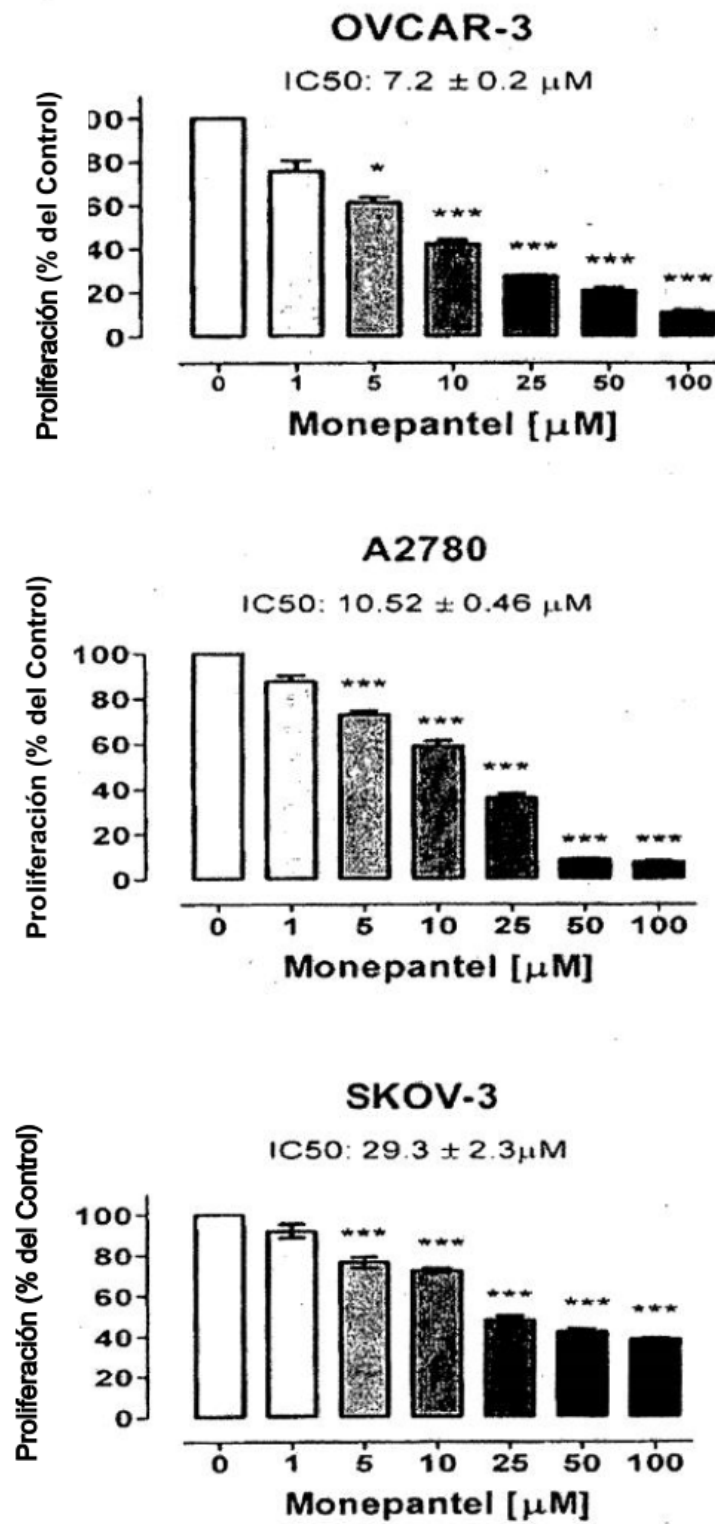


Figura 2

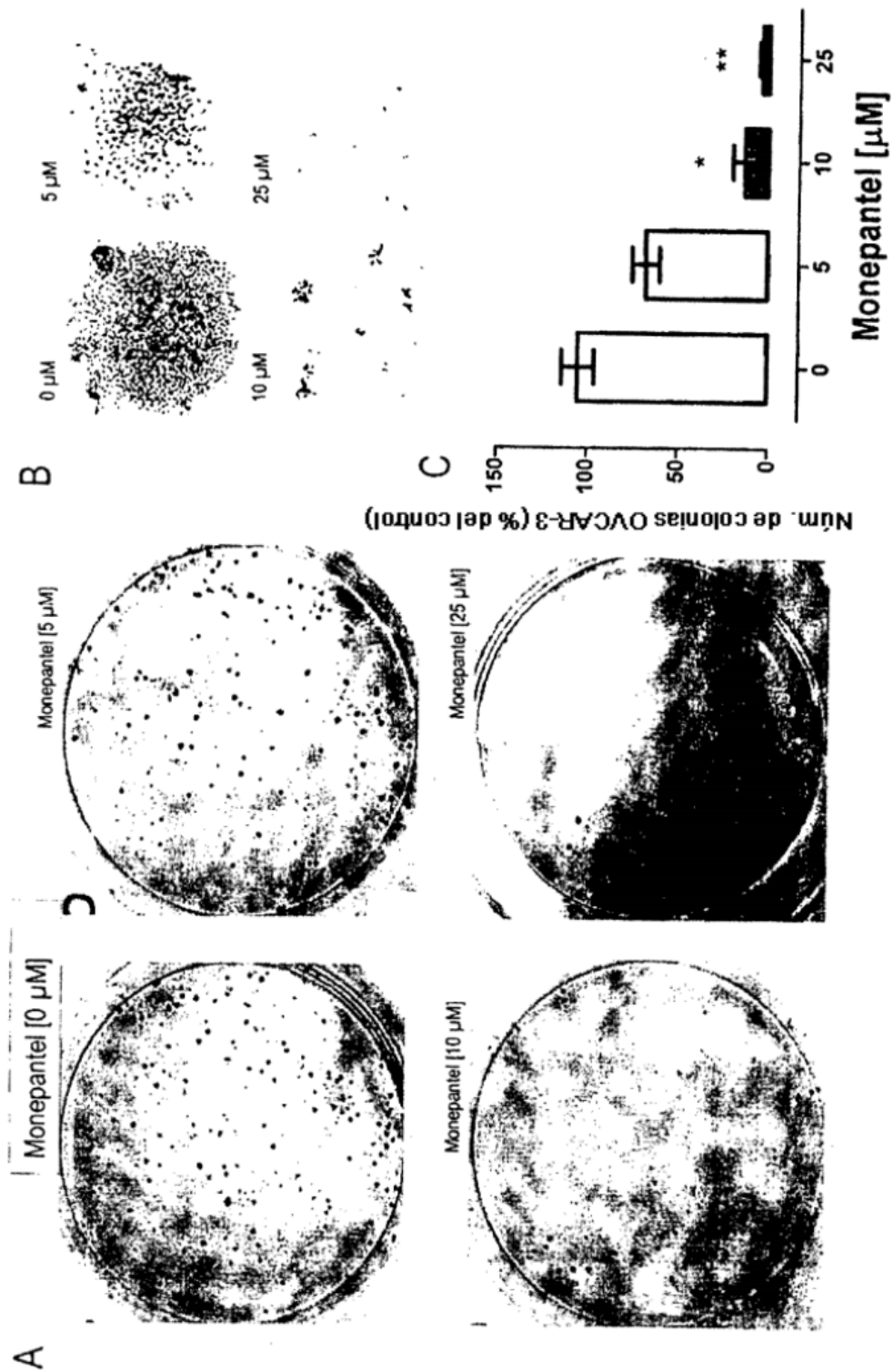


Figura 3a

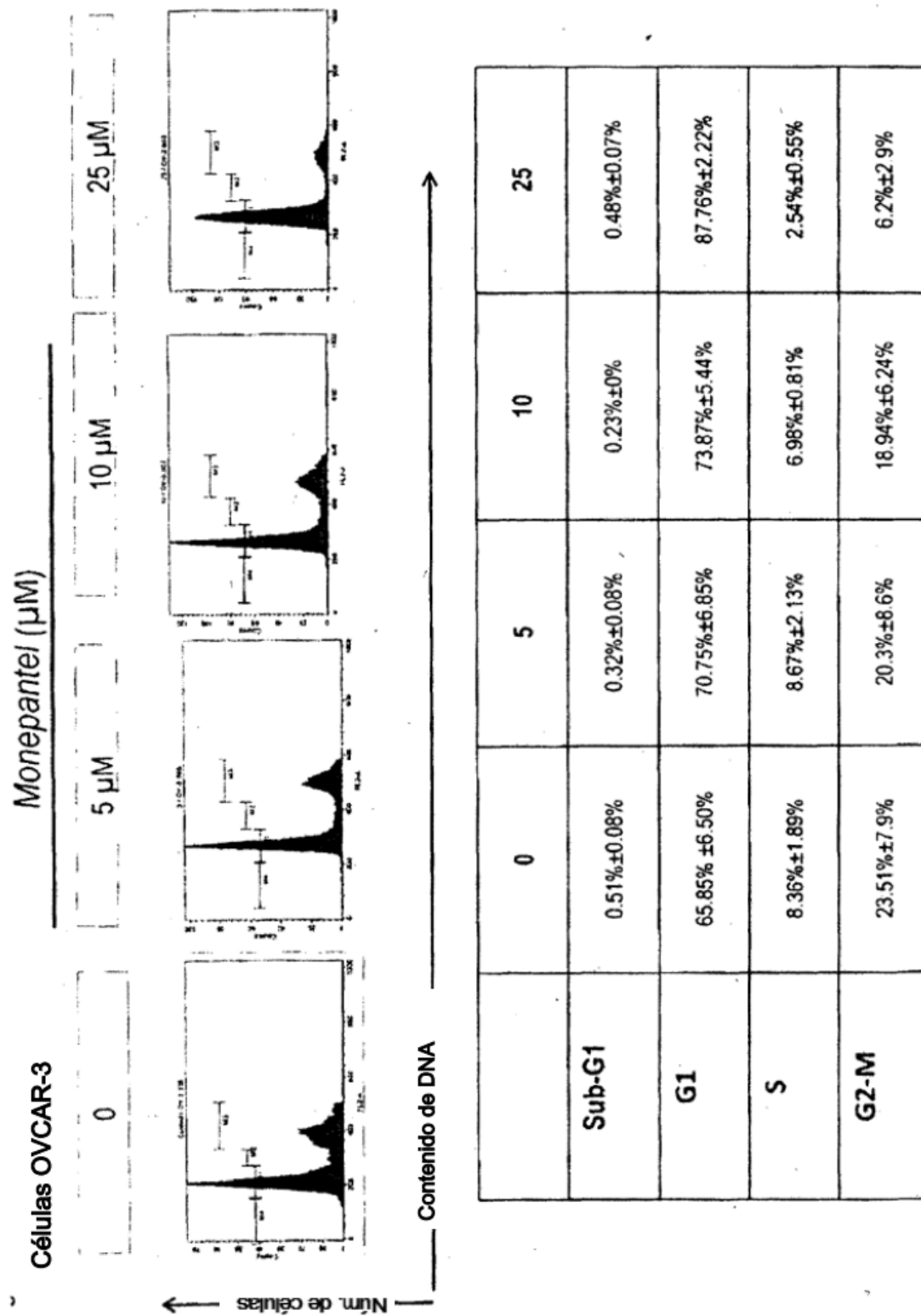


Figura 3b

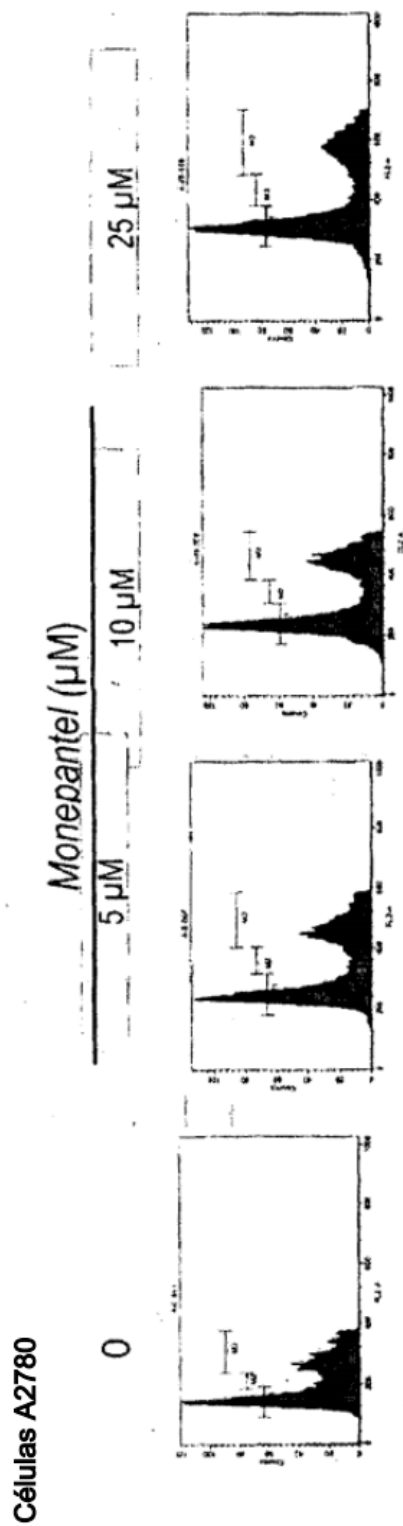


Figura 4

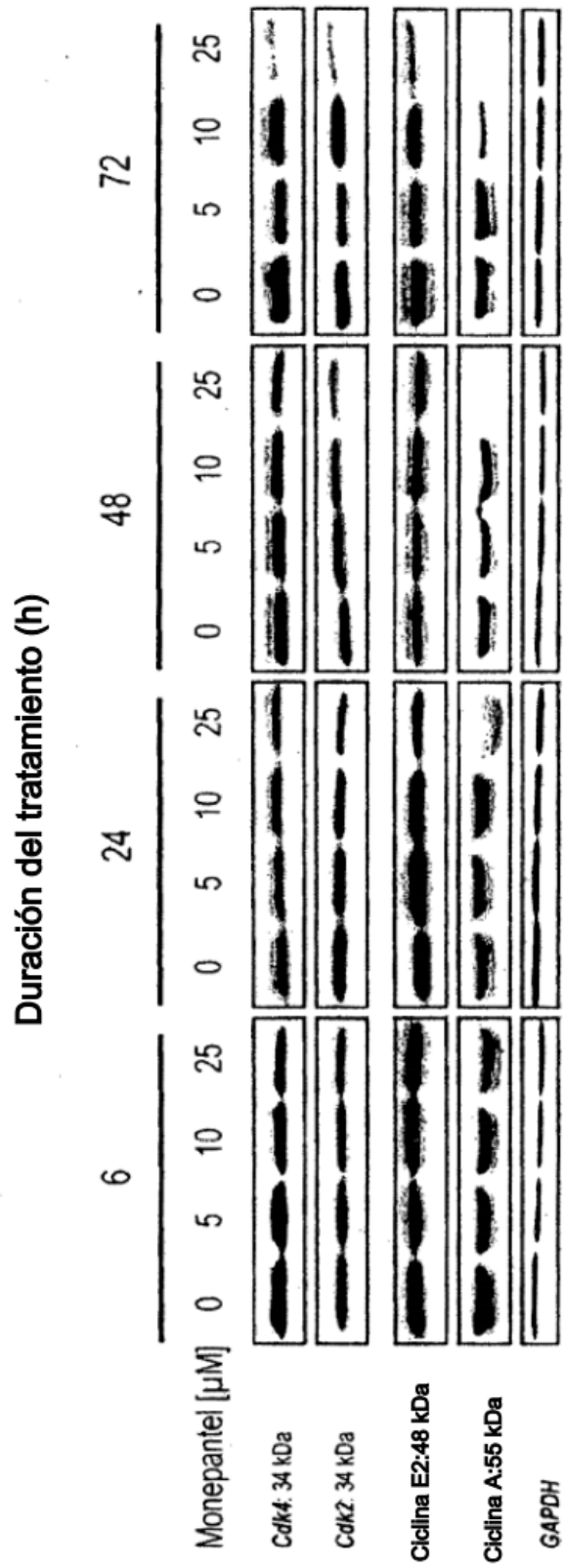


Figura 5

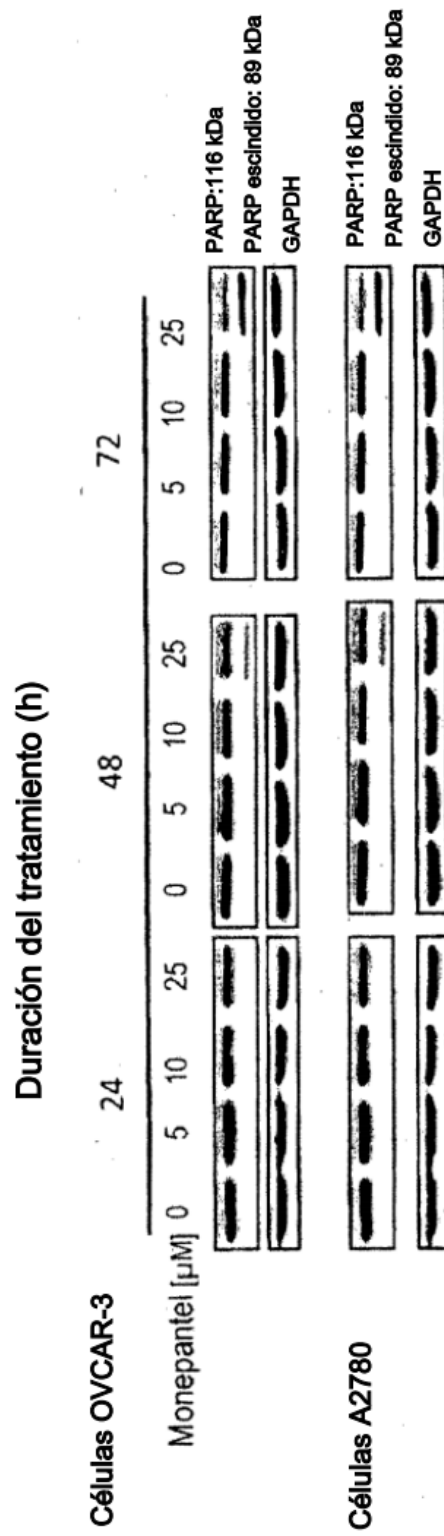


Figura 6

**Células A2780 tratadas durante 72 horas con
25 μ M de MPL**



**Células de Glioma U87 tratadas con
MPL-SO2**



Figura 7

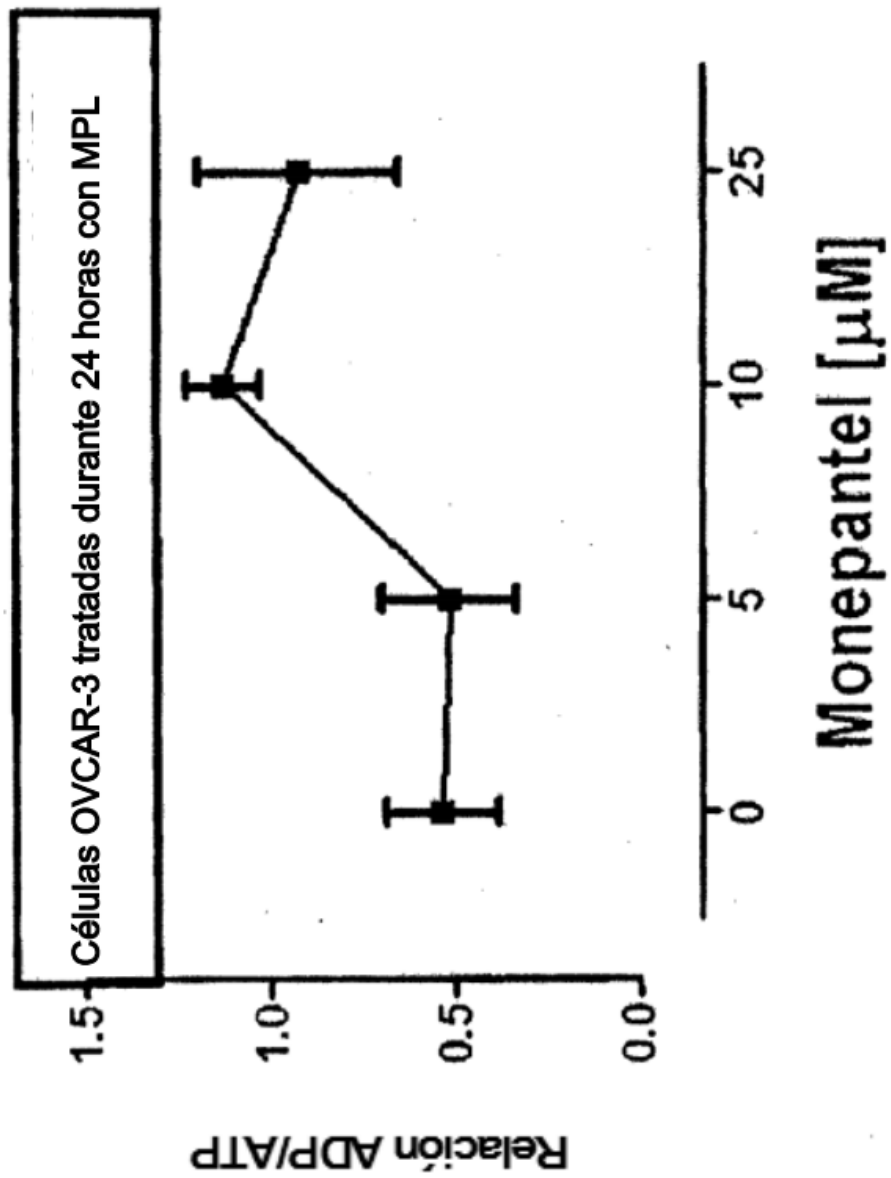


Figura 8

Monepantel reduce el nivel de ATP en células OVCAR-3 y A2780, después de 24 horas.

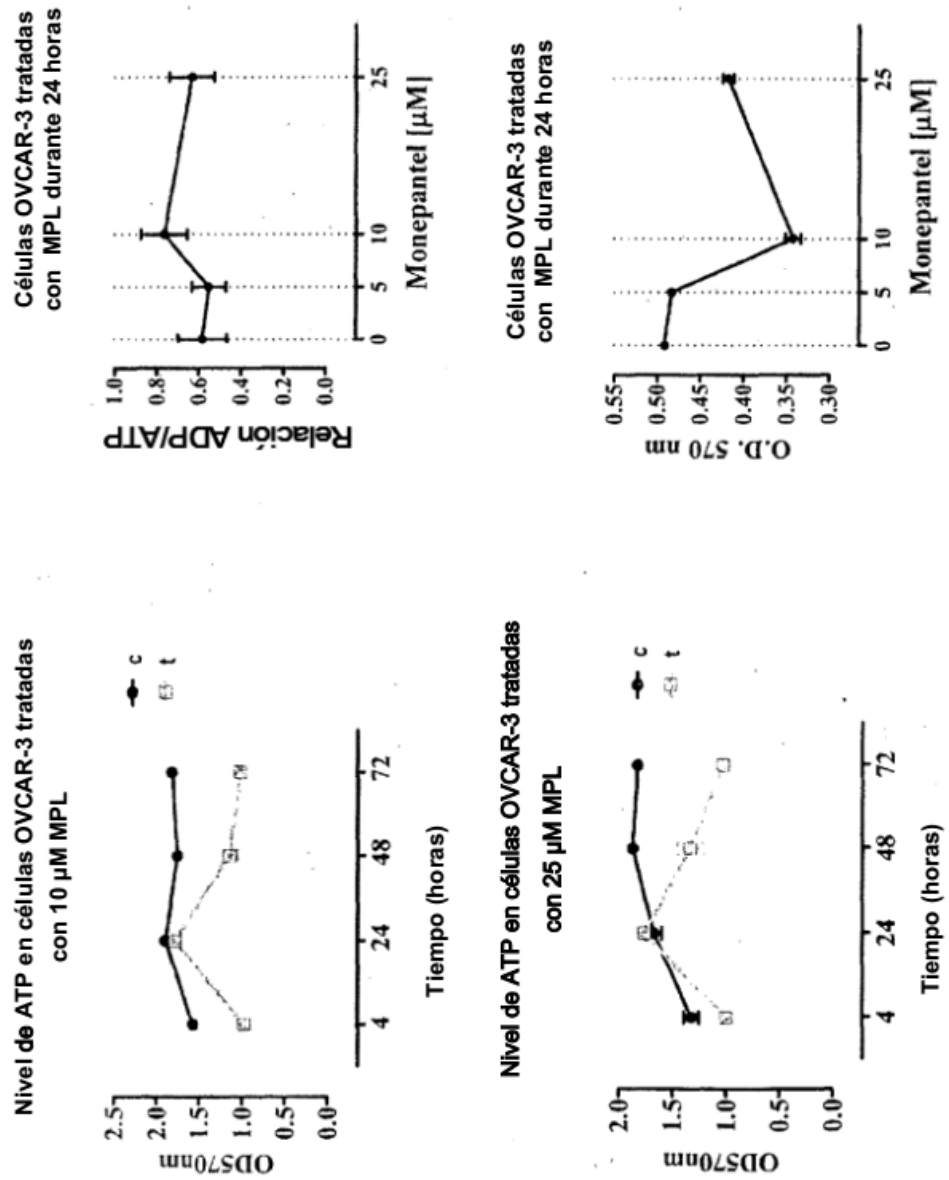


Figura 9

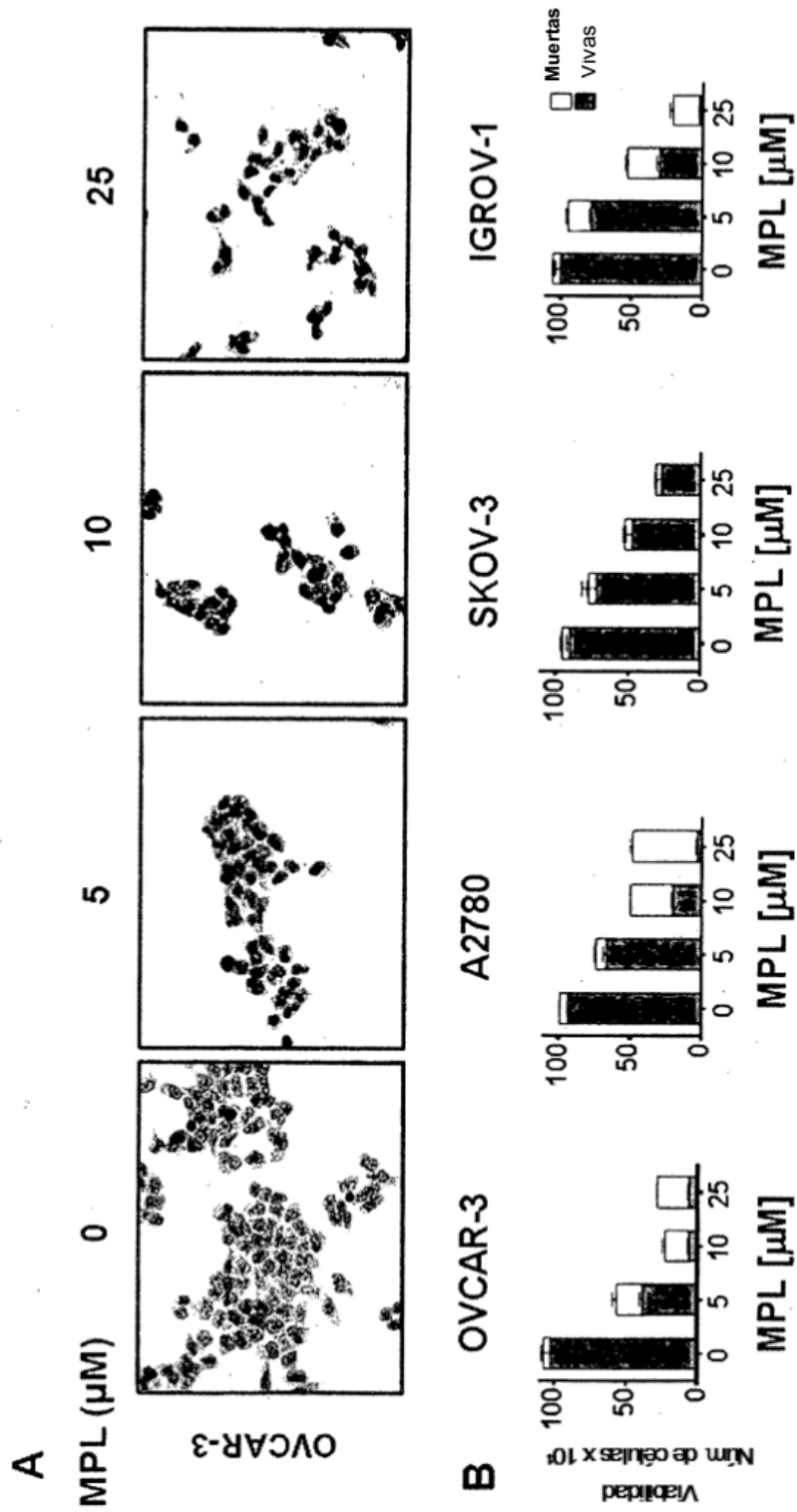


Figura 10

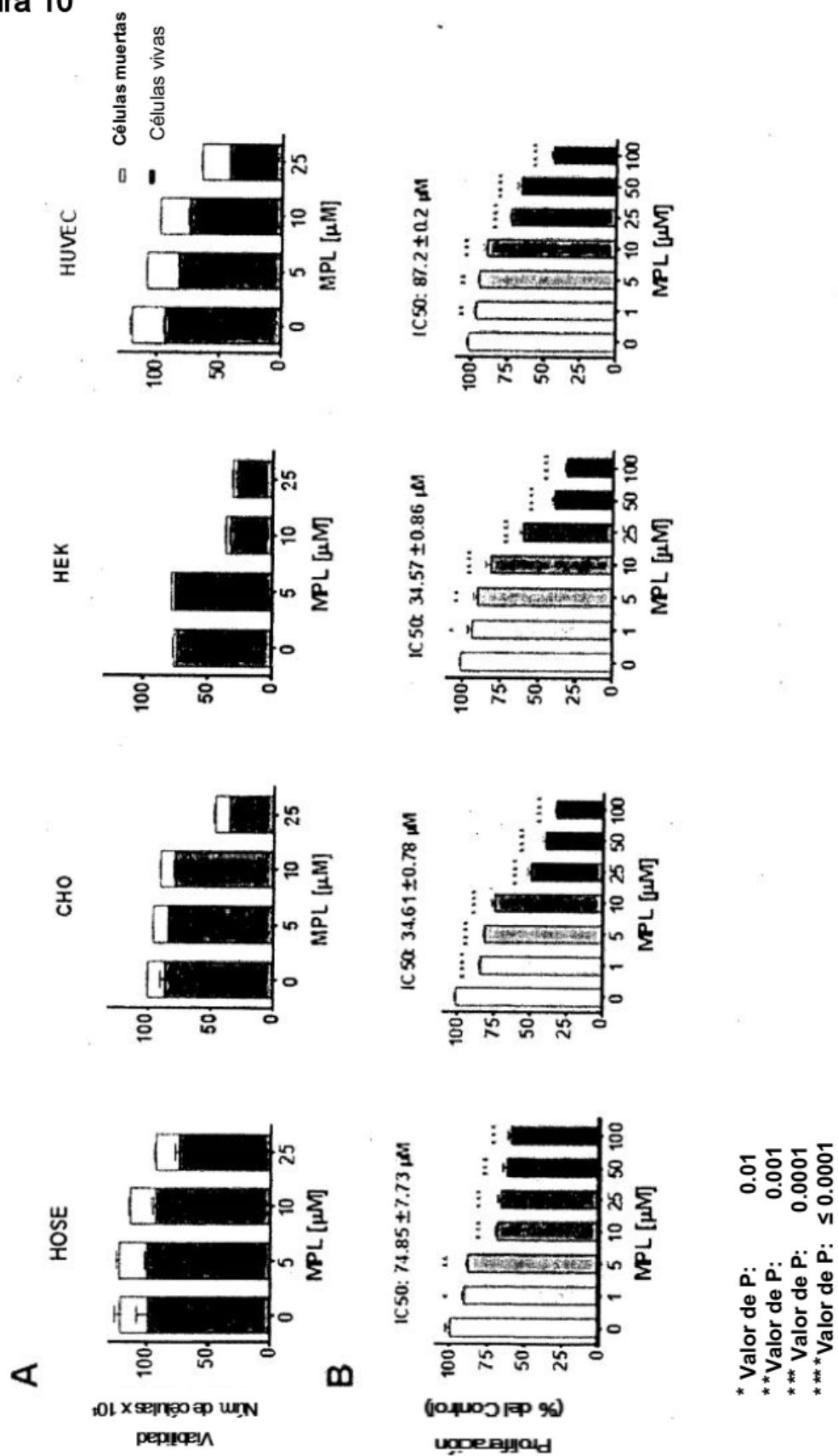
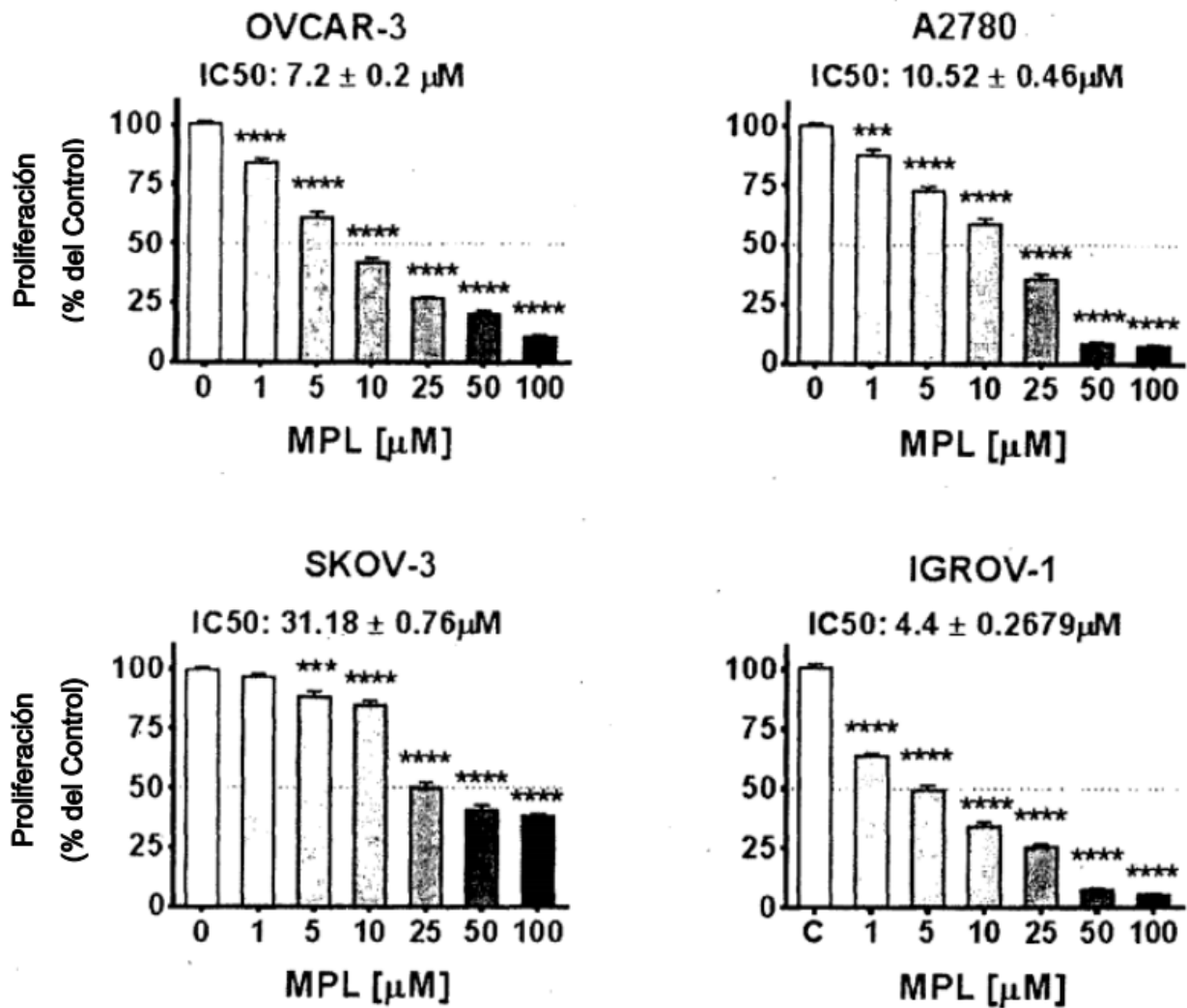


Figura 11



**** Valor de P: ≤ 0.0001

*** Valor de P: 0.0003

Sin asterisco Valor de P: 0.0699

Figura 12

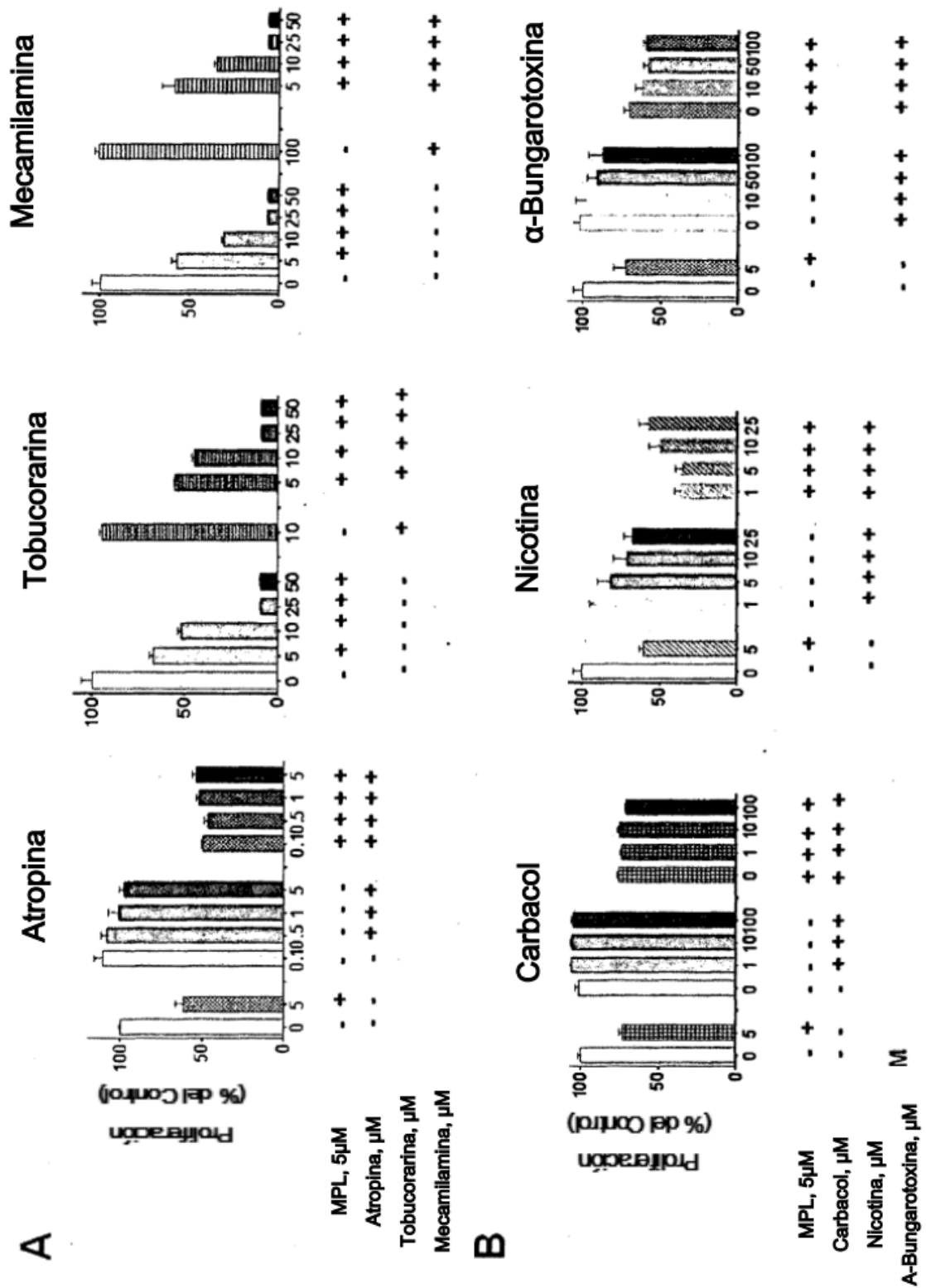


Figura 13

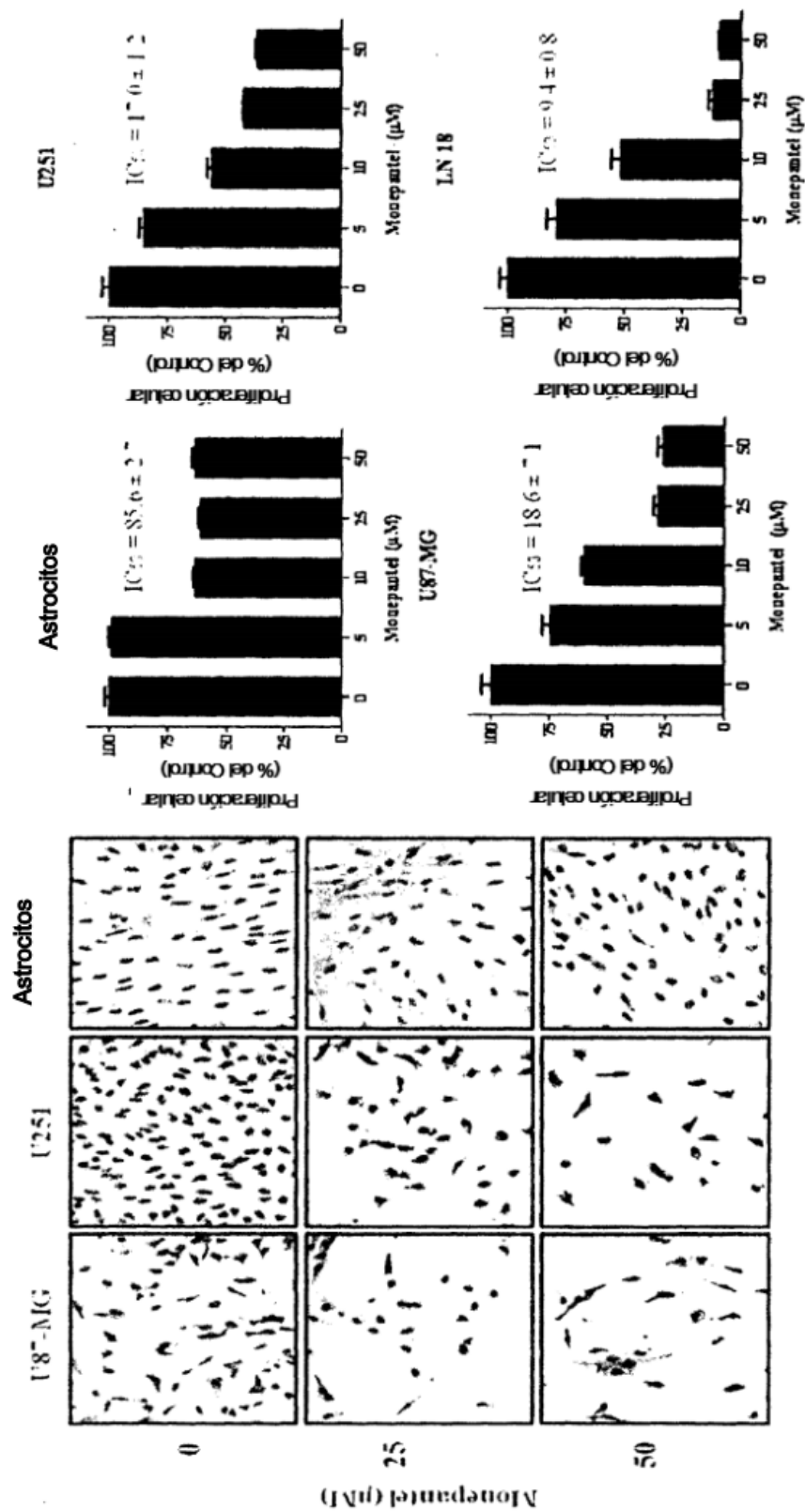


Figura 14

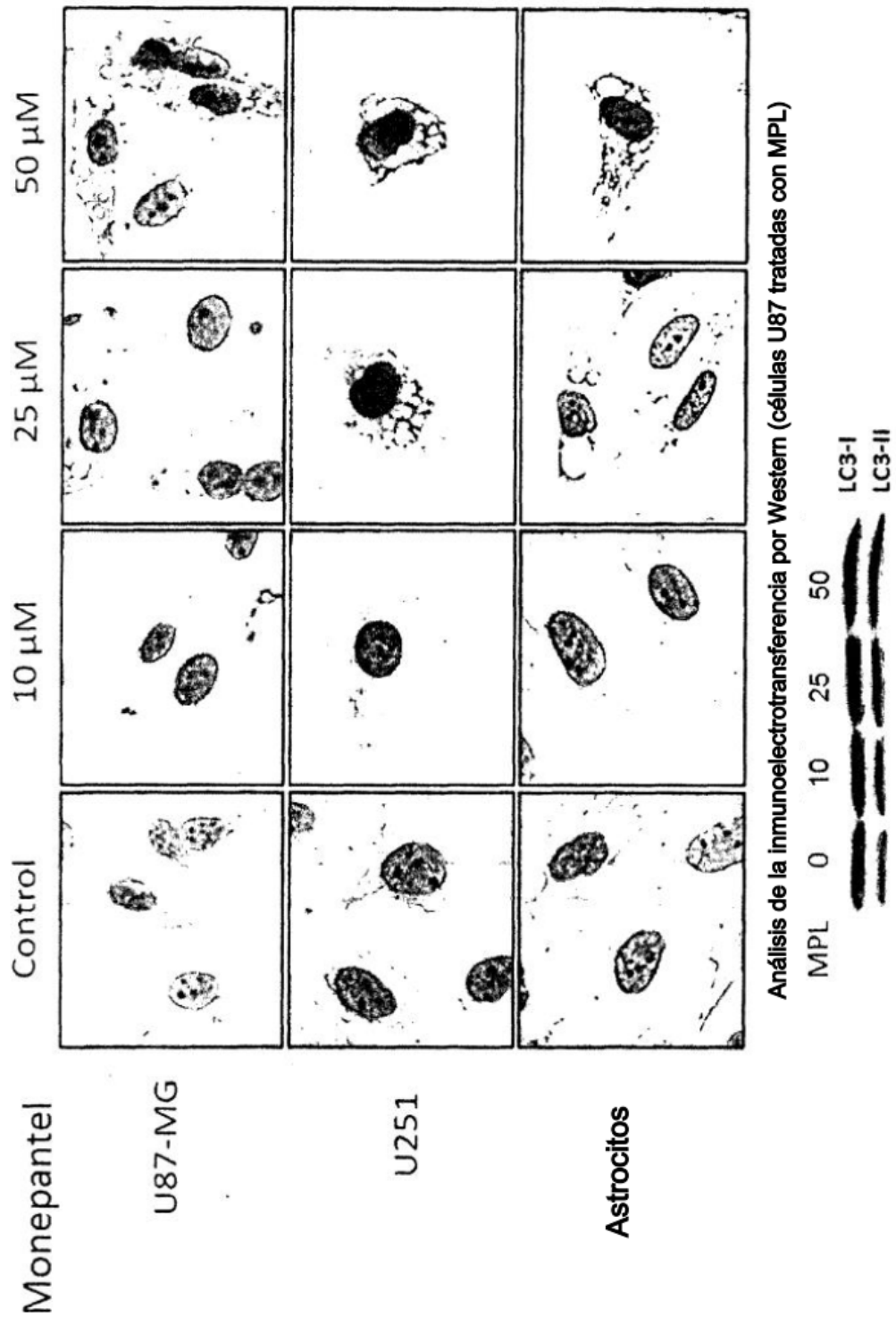


Figura 15

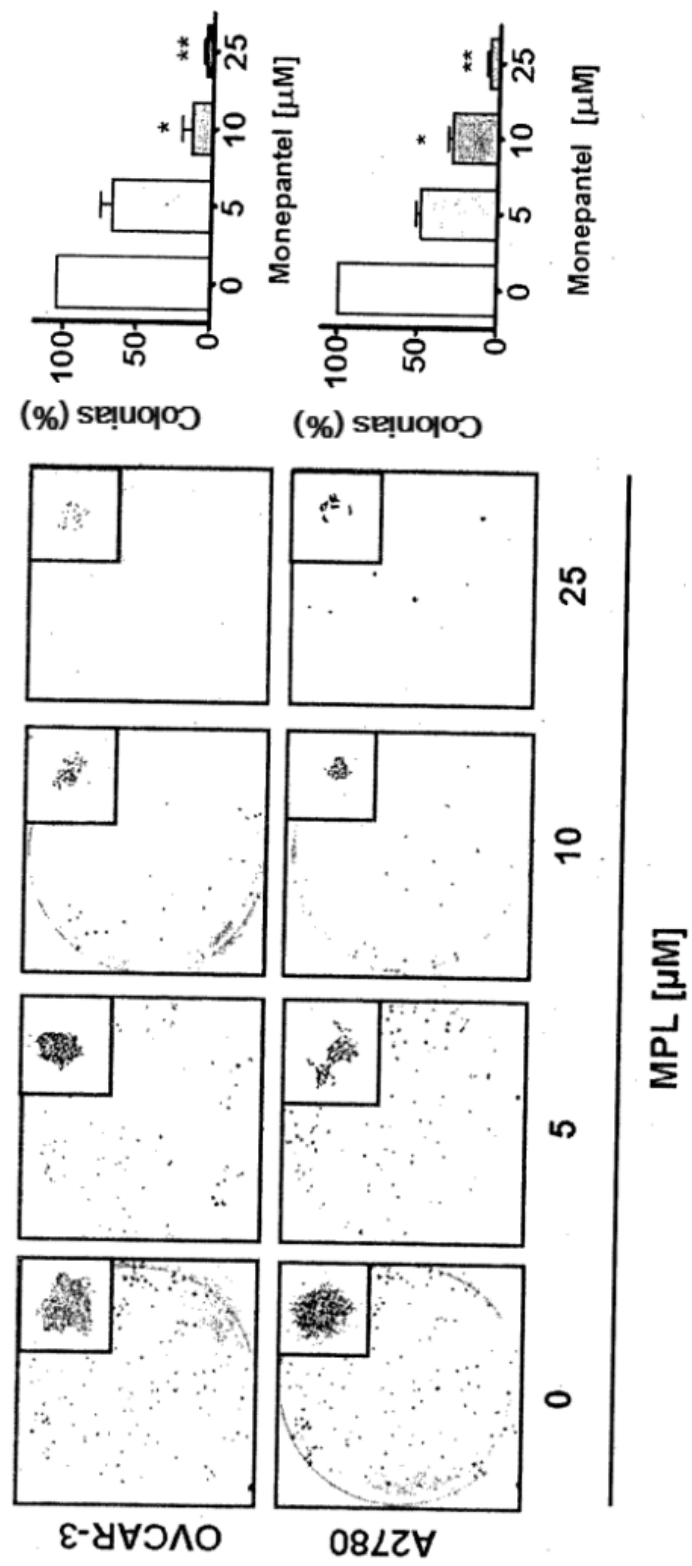


Figura 16

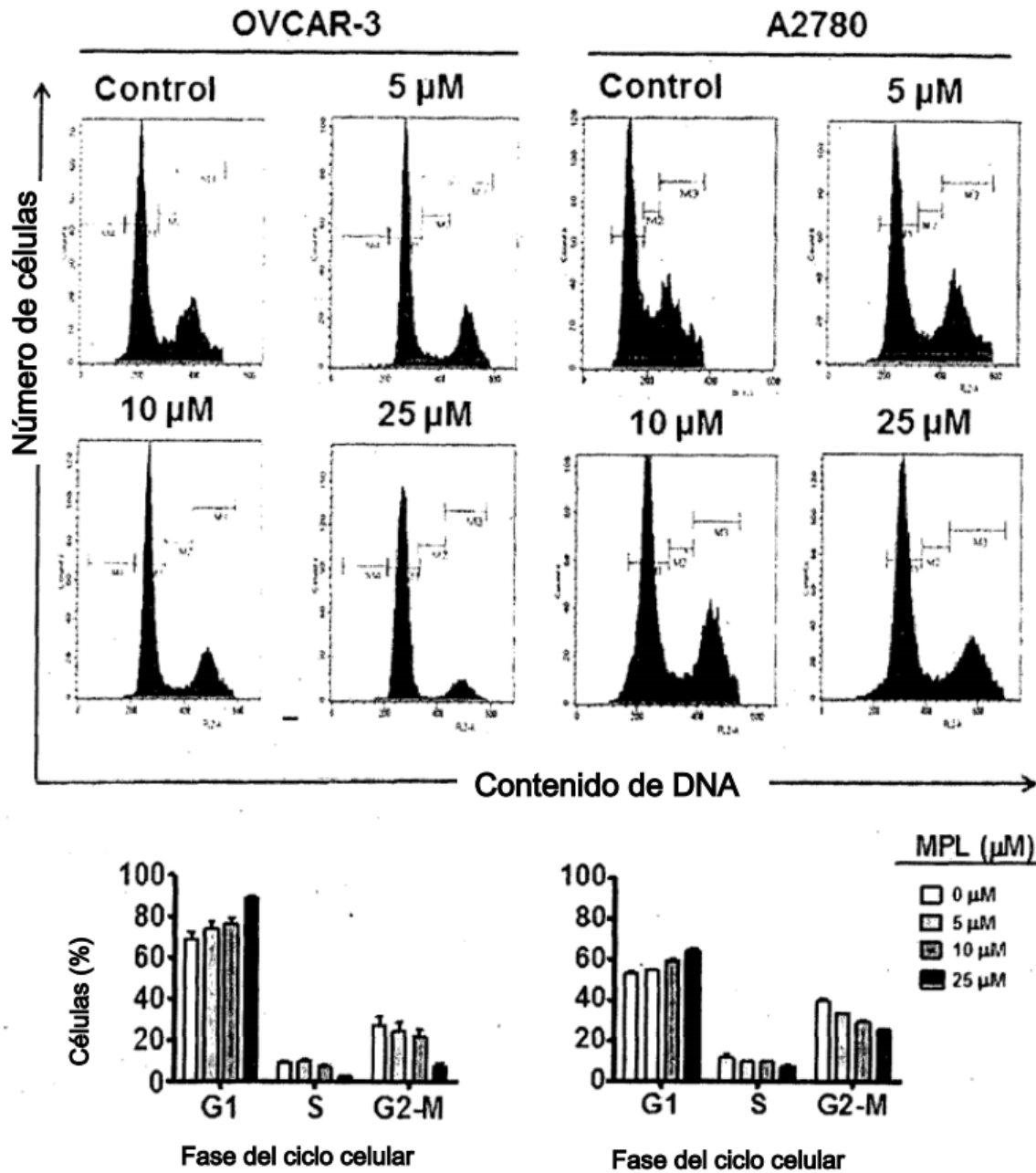


Figura 17

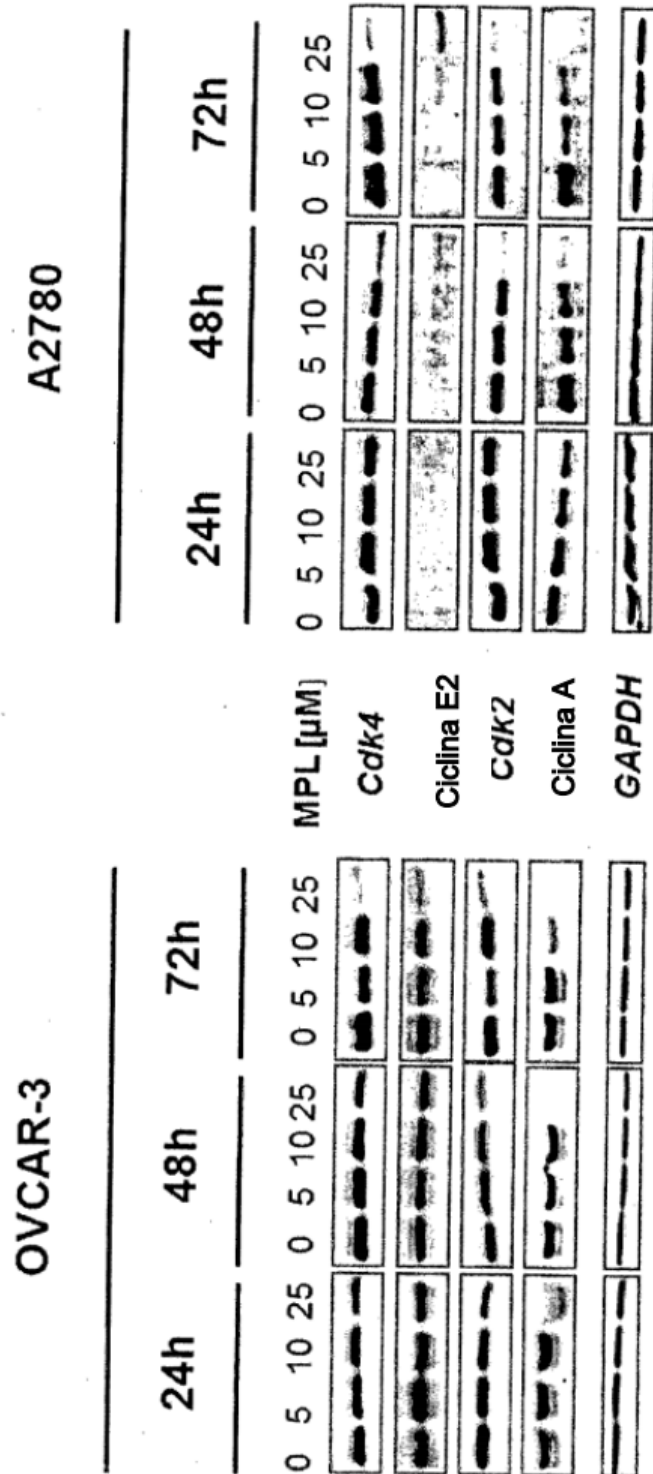


Figura 18

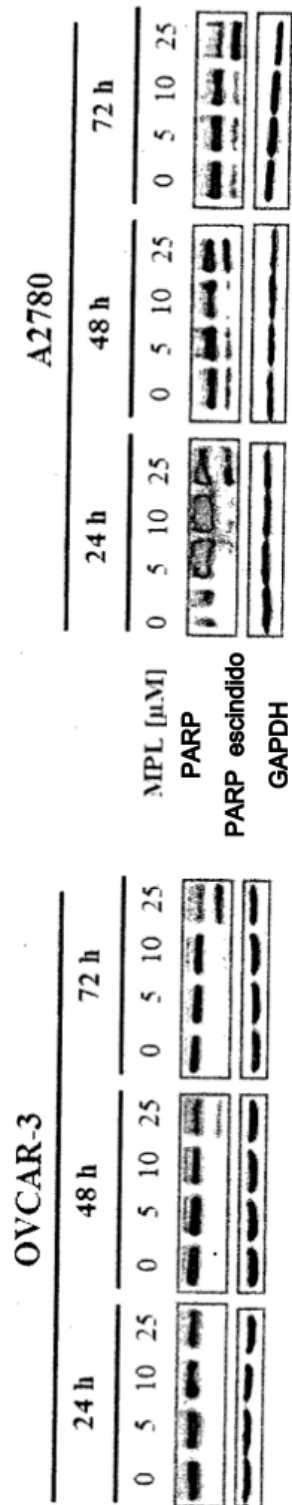


Figura 19A

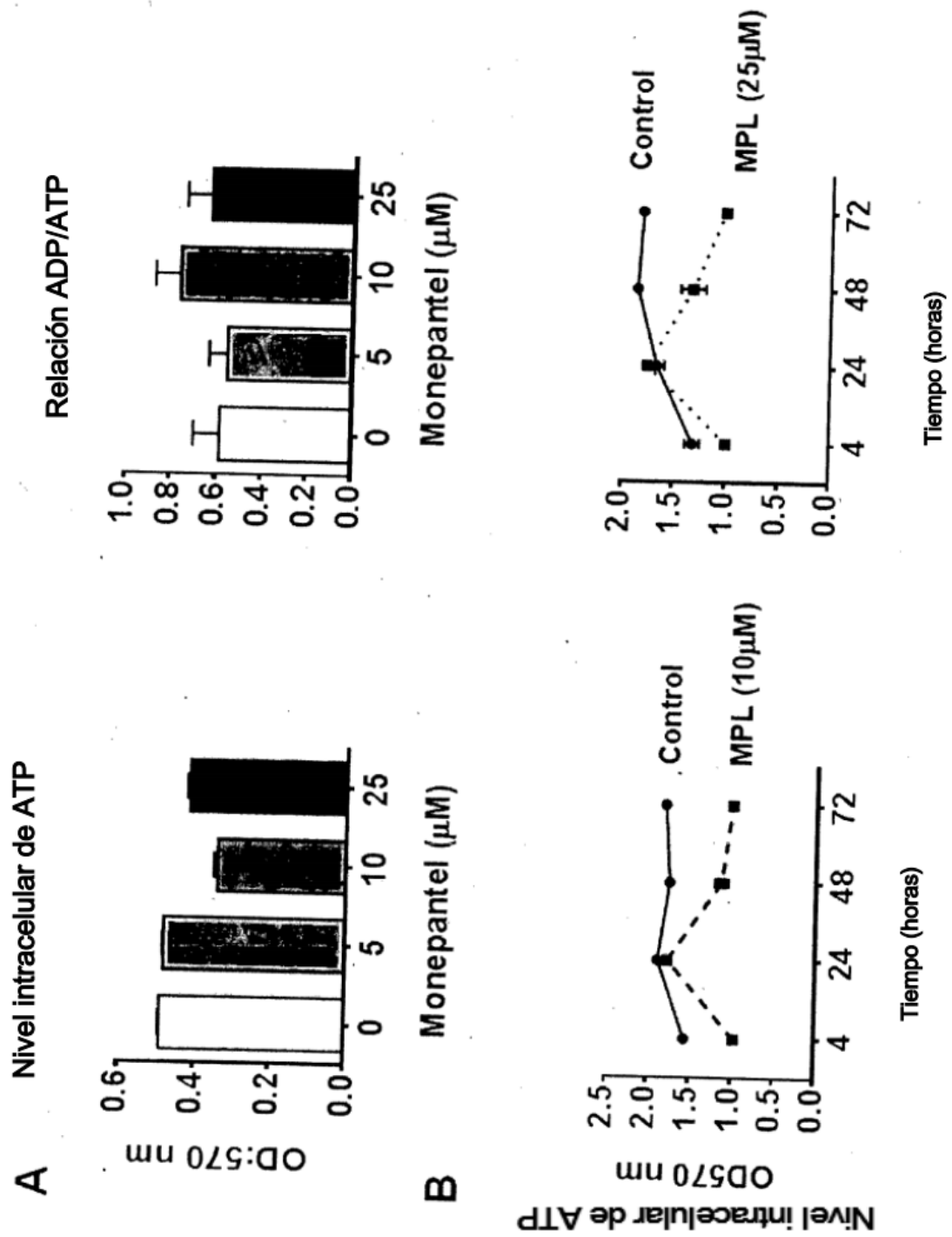


Figura 19B

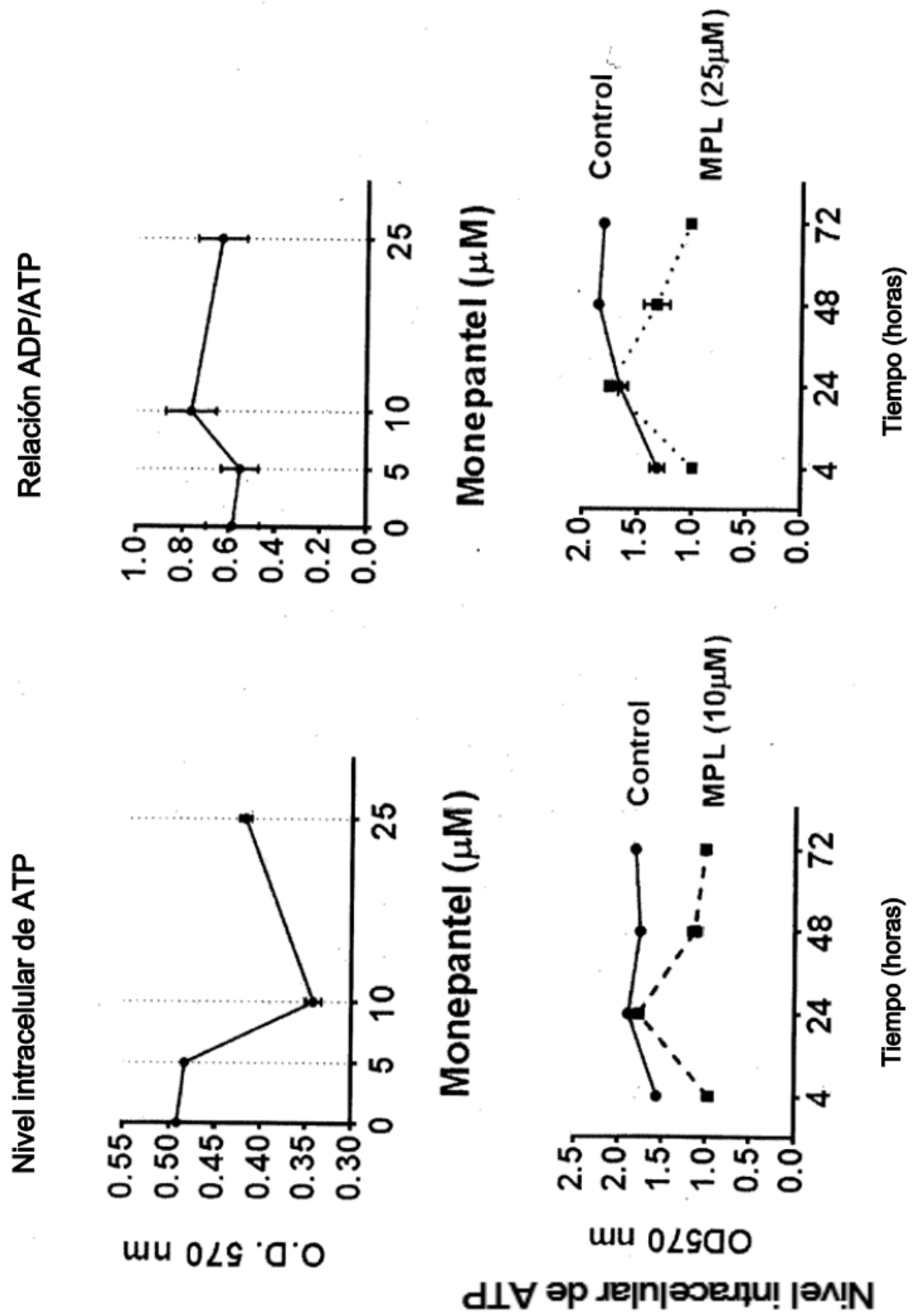


Figura 20

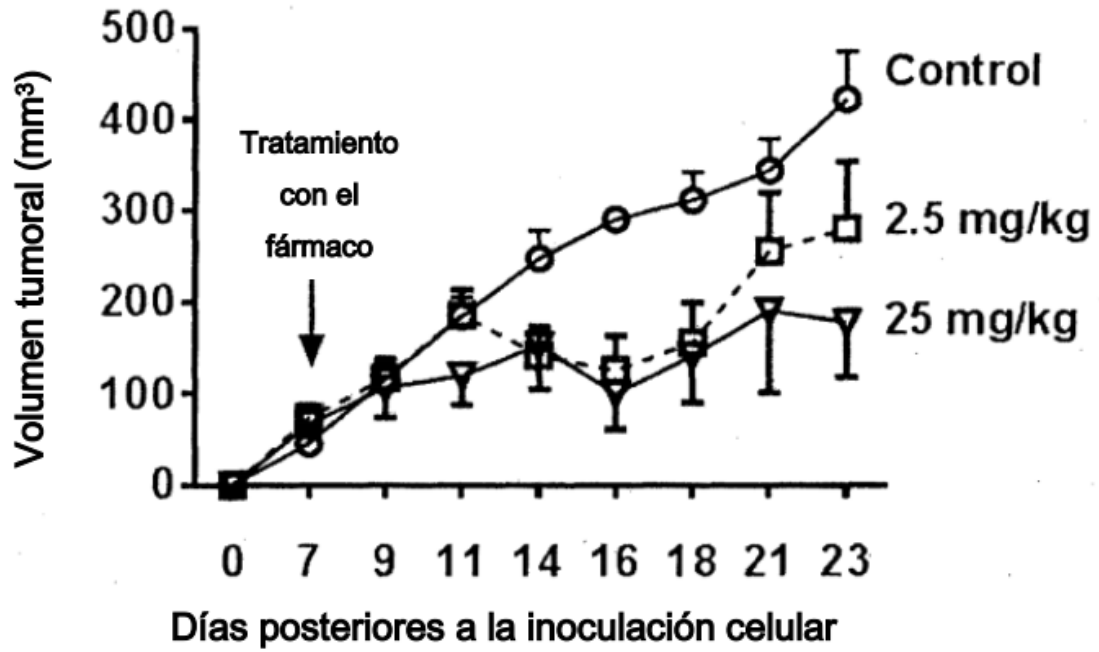


Figura 21

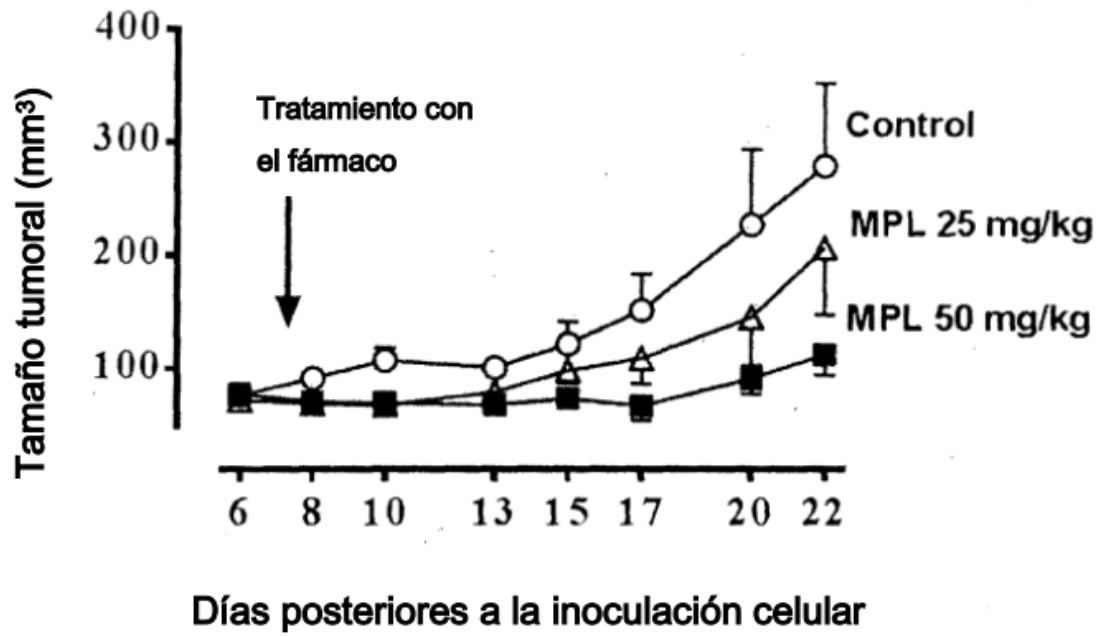


Figura 22

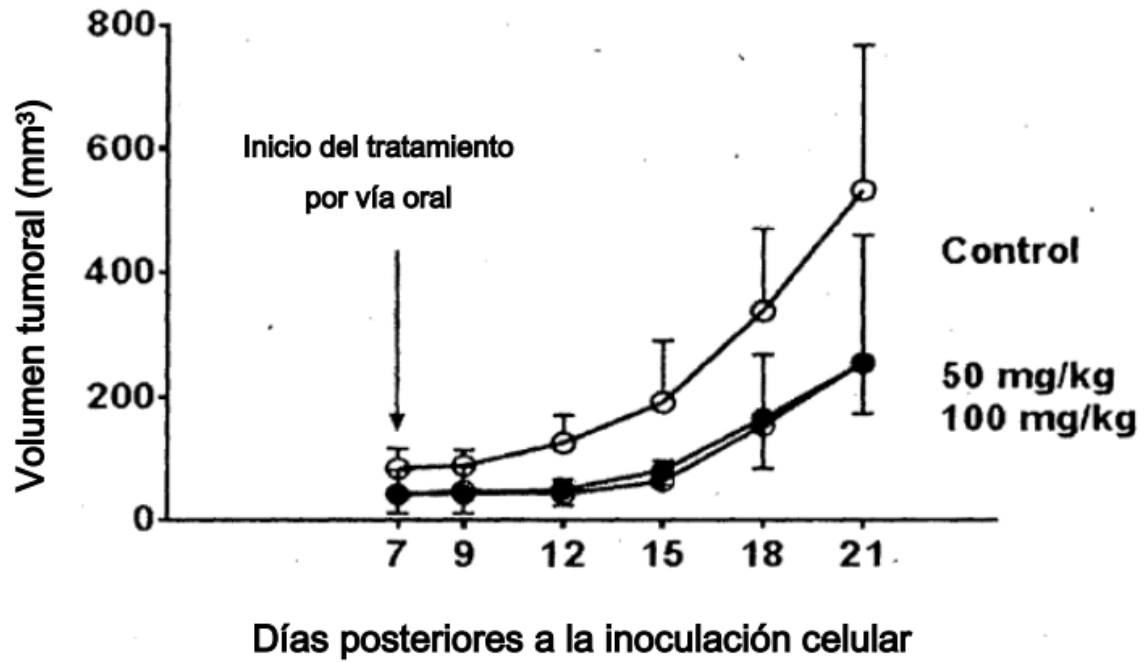


Figura 23



Figura 24

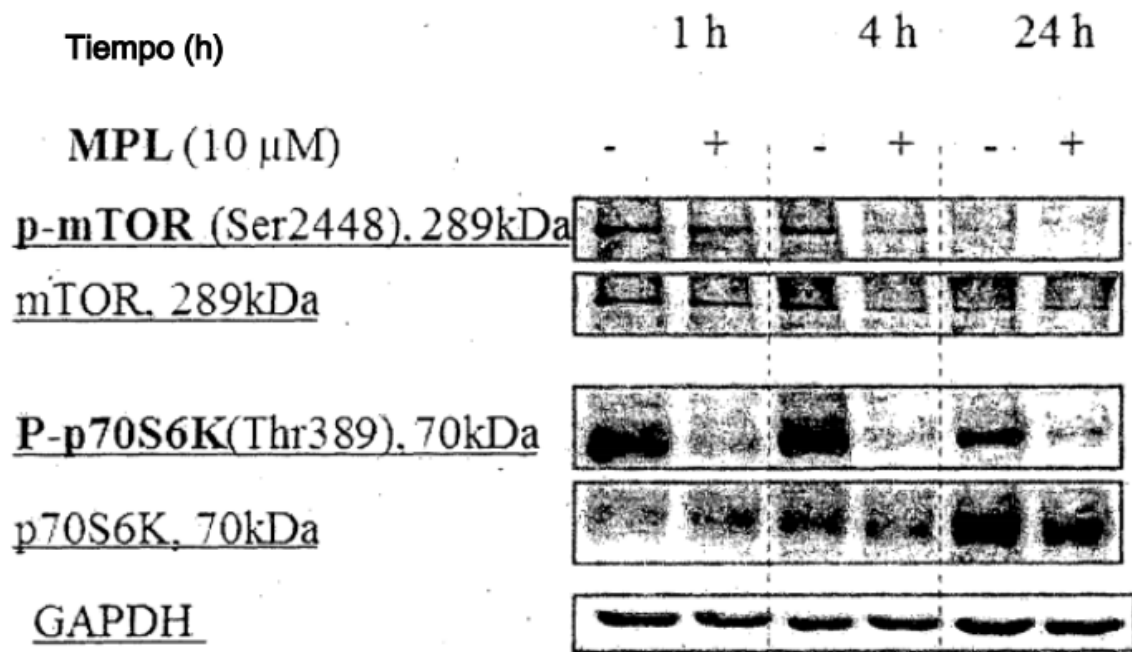


Figura 25

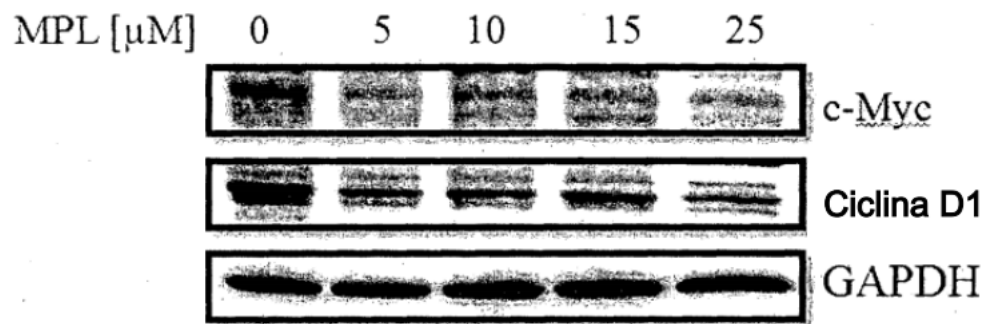


Figura 26

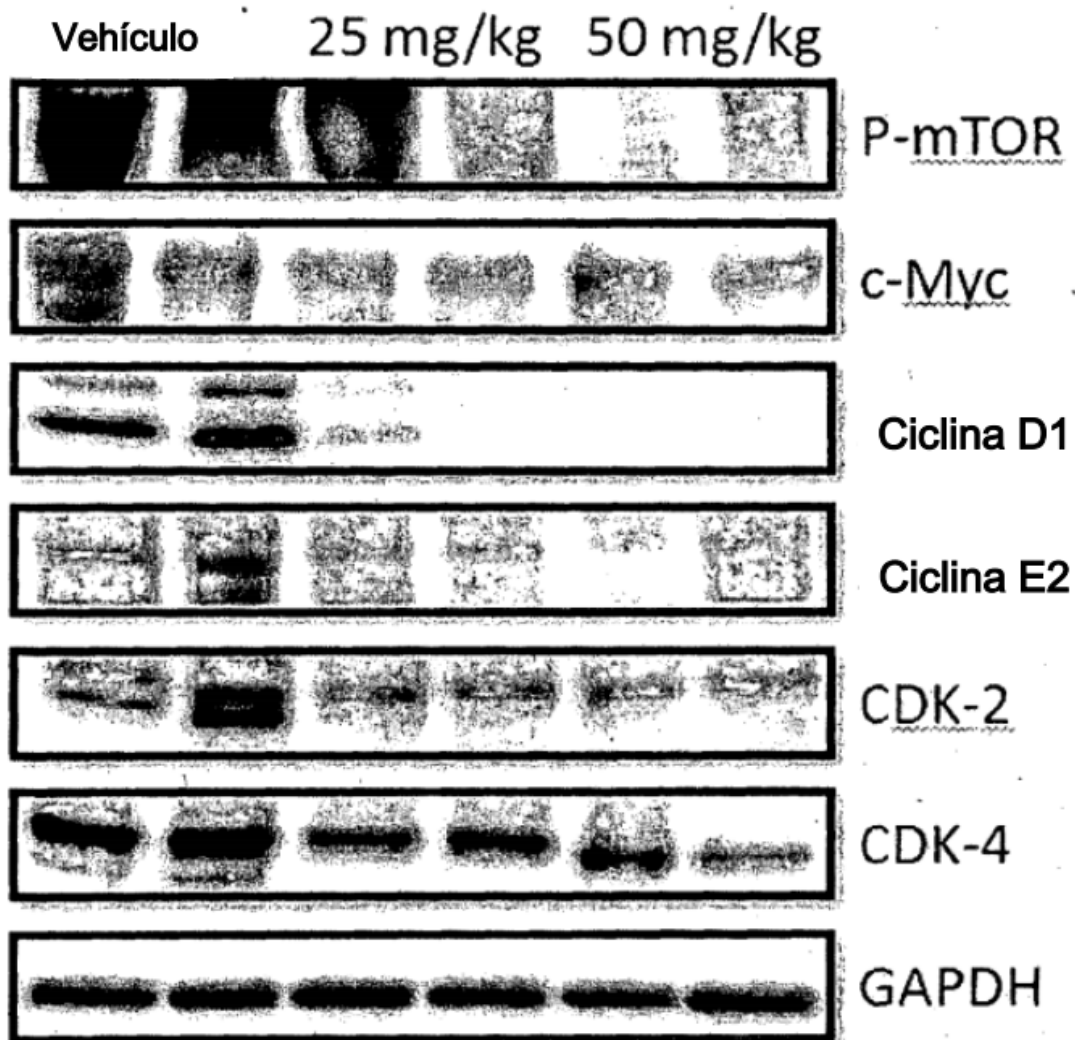


Figura 27A

MPL (25 μ M)	-	+	-	+
LPS (1 μ g/ml)	-	-	+	+
p-NF κ B				

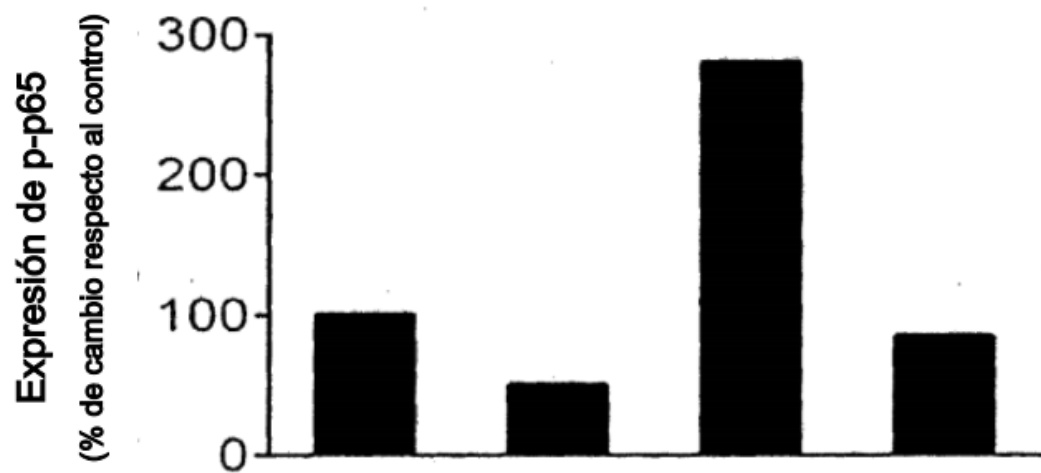


Figura 27B

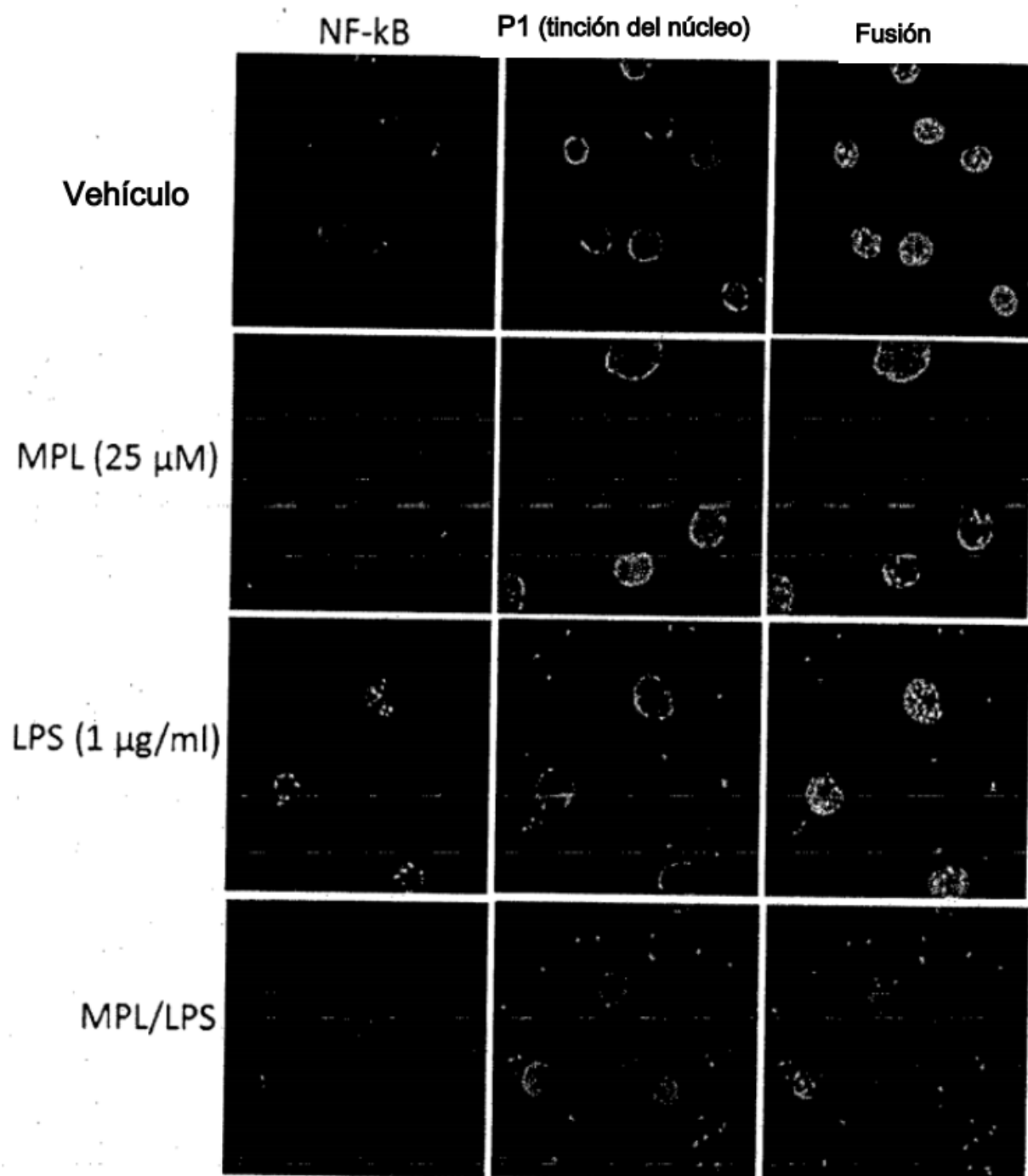


Figura 28

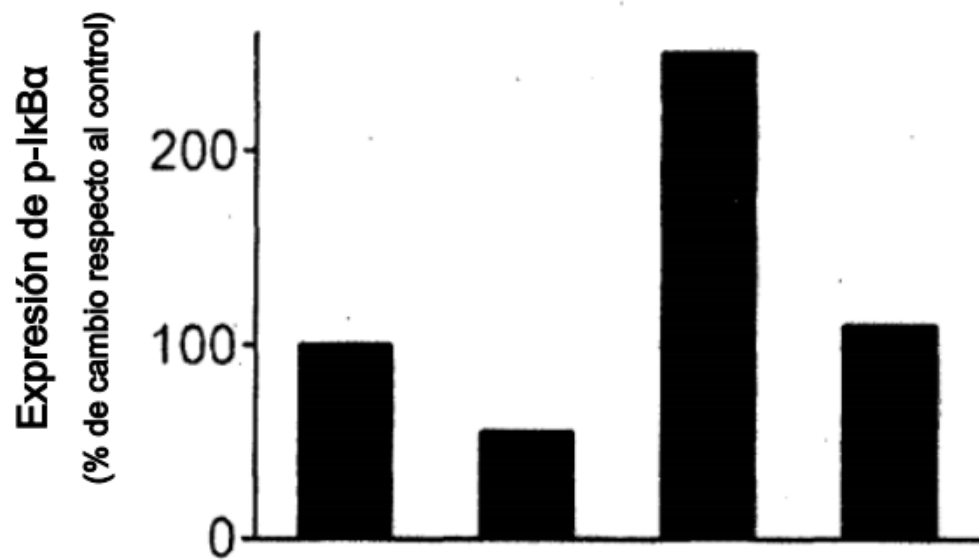
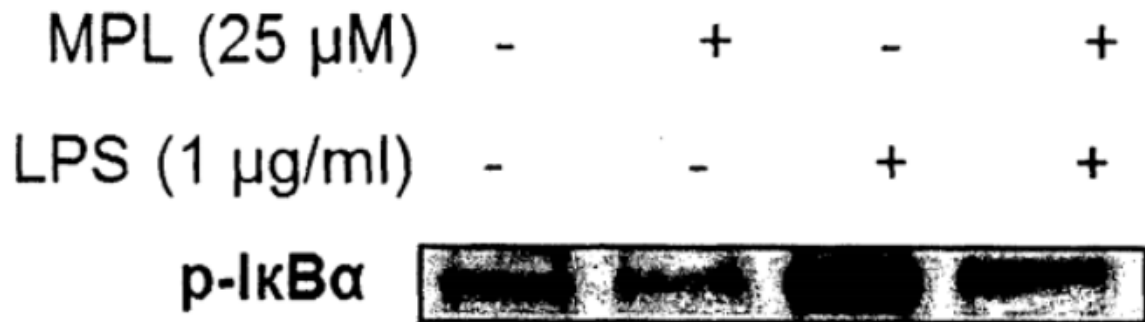


Figura 29

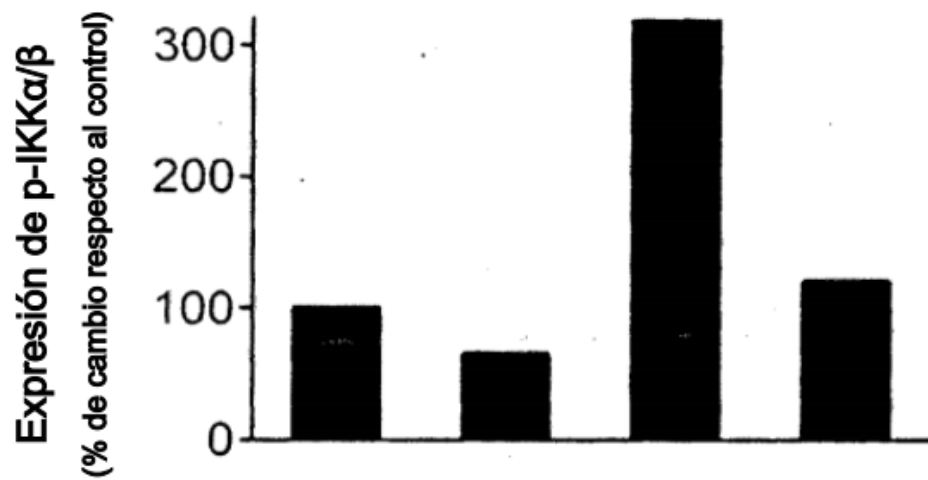
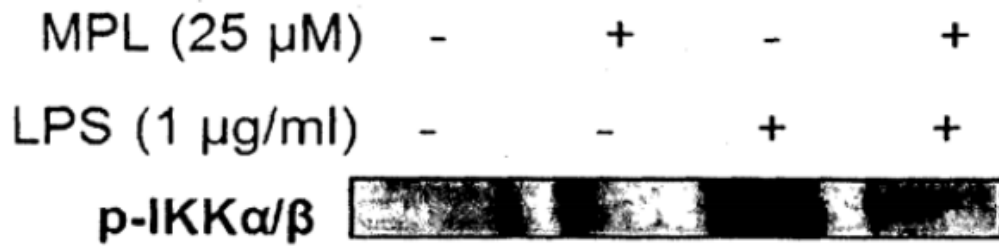


Figura 30

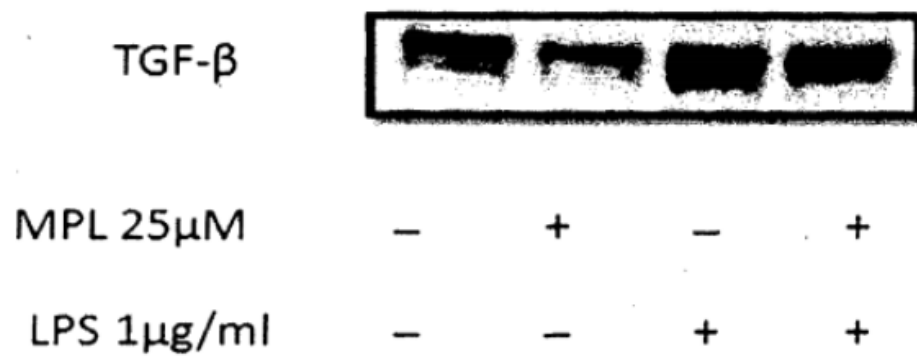


Figura 31

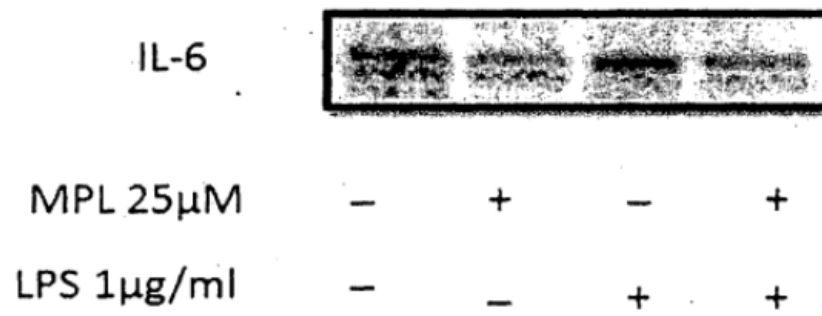


Figura 32

