

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 612**

51 Int. Cl.:

A61K 31/277 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07C 255/29 (2006.01)
C07C 317/14 (2006.01)
C07C 317/44 (2006.01)
C07C 323/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2013** **PCT/AU2013/000290**
87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013** **WO13138863**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2013** **E 13764613 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018** **EP 2817286**

54 Título: **Inhibidores de cinasa para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

23.03.2012 AU 2012901199

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2018

73 Titular/es:

PITNEY PHARMACEUTICALS PTY LIMITED
(100.0%)
Suite 39, 1 Freshwater Parade
Claremont, Western Australia 6010, AU

72 Inventor/es:

MORRIS, DAVID LAWSON

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 685 612 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

Inhibidores de cinasa para el tratamiento del cáncer.

5 **Campo técnico**

En general, la presente invención se refiere a inhibidores de cinasa para el tratamiento del cáncer. Específicamente, la presente invención se refiere a la utilización de derivados de aminoacetonitrilo (AAD) en el tratamiento del cáncer.

10

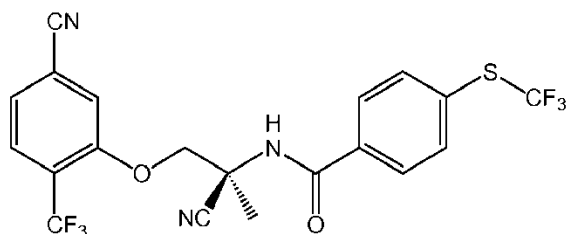
Antecedentes

15

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

20

El monepantel (MPL) (N-[(1S)-1-ciano-2-(5-ciano-2-trifluorometil-fenoxi)-1-metil-etil]-4-trifluorometilsulfanil-benzamida) es un ejemplo de dichos AAD y ha sido aprobado como nematicida para el tratamiento de los parásitos gastrointestinales ovinos.



MPL

25

Se ha demostrado que el MPL resulta eficaz contra diversas especies de nematodos patogénicos en el ganado.

30

El documento CN102127074 da a conocer alcaloides beta-carbolín-1-cetona sustituidos con 6-sulfamilo y un método de preparación de los mismos, una composición medicinal que contiene los compuestos, la aplicación médica de los compuestos y especialmente la utilización de inhibidor de cinasa 2 dependiente de una proteína del ciclo celular.

35

Ducray *et al.* (Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 18(9):2935-2938, 2008) dan a conocer una serie de derivados aminoacetonitrilo (AAD) que muestran una elevada actividad antihelmíntica contra especies de nematodo parasitario, tales como *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*. Estos compuestos muestran además actividad contra cepas de nematodos resistentes a otros antihelmínticos de amplio espectro.

40

Como nematicida, MPL afecta a los canales iónicos activados por ligando de manera que conduce a la interferencia en la transducción de señales en las sinapsis neuromusculares. Los parásitos afectados experimentan seguidamente una desregulación de la contracción muscular, parálisis, necrosis y defectos en la muda. Se han identificado tres genes relacionados con el receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) como dianas primarias del MPL y la totalidad de los tres genes codifican proteínas que representan la subfamilia de DEG-3 de subunidades de nAChR que se encuentran presentes únicamente en nematodos. El gen de DEG-3 codifica la subunidad α de nAChR que presenta similitudes con el de la subunidad $\alpha 7$ en el segundo dominio transmembranario.

45

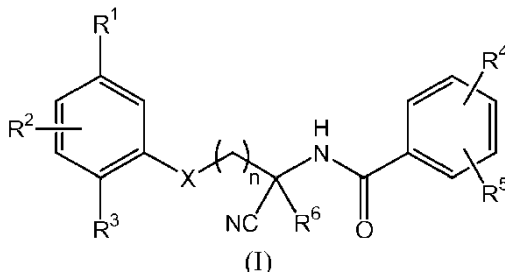
50

Se ha descubierto inesperadamente que los AAD también resultan eficaces en el tratamiento de los cánceres. Uno de los mayores retos médicos en los últimos 50 años ha sido la identificación de fármacos que pueden eliminar eficazmente las células tumorales sin dañar los tejidos normales. El perfil de efectos secundarios de prácticamente la totalidad de las clases conocidas de fármaco anticanceroso resulta esencial en la limitación de la capacidad médica de tratar el cáncer del paciente, especialmente en estadios tardíos, cuando con frecuencia se desarrolla la resistencia al fármaco. Aunque otros fármacos antihelmínticos, tales como los benzimidazoles, es conocido que resultan eficaces en el control del crecimiento y desarrollo de las células cancerosas, la inesperada actividad anticanceroso y baja toxicidad de los compuestos de fórmula (I), tal como MPL, permite regímenes de administración más flexibles para la terapia del cáncer con efectos secundarios limitados.

55

Sumario de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula (I) para la utilización en el tratamiento de uno o más cánceres según la reivindicación adjunta 1:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que:

R¹ es -CN; R² y R³ y R⁵ se seleccionan, cada uno independientemente, de H, alquilo, halógeno, -CF₃ o -CN,

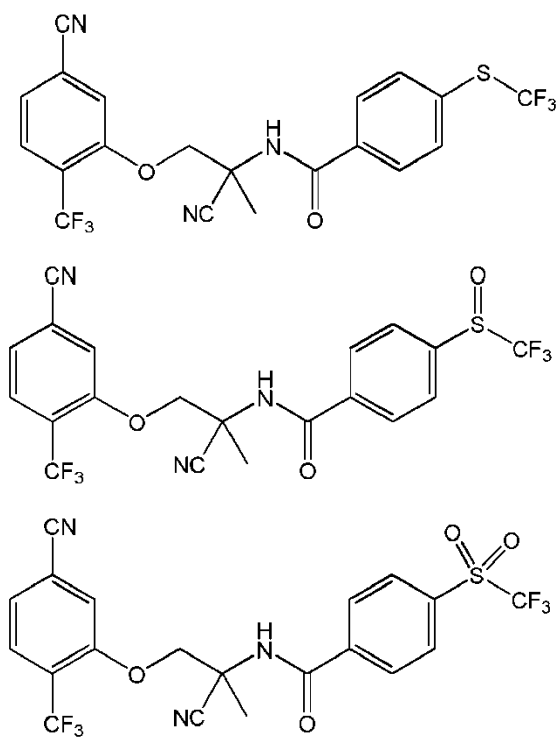
R⁴ y R⁶ se seleccionan, cada uno independientemente, de H, alquilo, halógeno, alcoxi, -CF₃, -OCF₃, -SO₂CF₃, -SO₂CF₃ o -S-CF₃,

X es un heteroátomo, N(alquilo) o NH y
n es 1 a 20.

Preferentemente, R² es H o halógeno. Más preferentemente, R² es H. Preferentemente, R³ es -CF₃ o halógeno. Más preferentemente, R³ es -CF₃. Preferentemente, R⁴ es -S-CF₃, -SO₂CF₃, -SO₂CF₃, -OCF₃ o -CF₃. Más preferentemente, R⁴ es -S-CF₃ o -SO₂CF₃. Preferentemente, R⁵ es H. Preferentemente, X es O. Preferentemente, n es 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 2, o 1. Más preferentemente, n es 1. Preferentemente, R⁴ se orienta en *para* respecto a la fracción 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).

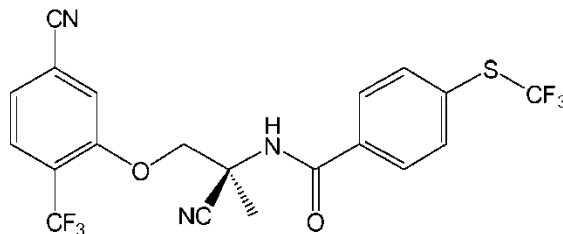
Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) se selecciona de entre cualquiera de los compuestos siguientes:



en los que cada uno de los compuestos anteriormente indicados es el enantiómero (R) o (S), o el racemato, o

una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

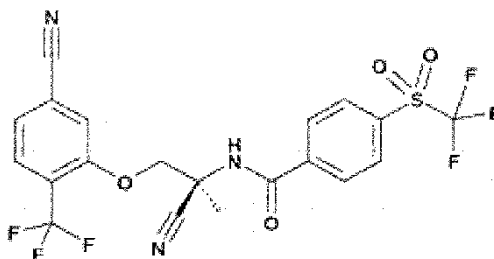
Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) es MPL
(N-[(1S)-1-ciano-2-(5-ciano-2-trifluorometil-fenoxi)-1-metil-etil]-4-trifluorometilsulfanil-benzamida):



MPL

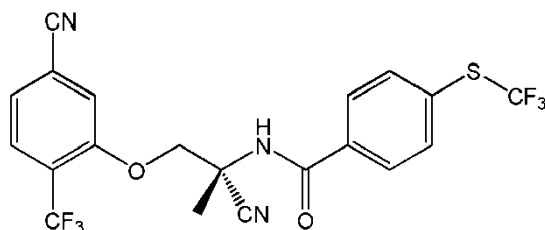
o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) es sulfona de monepantel (MPL-SO₂):



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Más preferentemente, el compuesto de fórmula (I) se selecciona de cualquiera de los compuestos siguientes:



AAD 2224 (MPL-(R));

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Preferentemente, el cáncer según la reivindicación 1 se encuentra asociado a una cinasa.

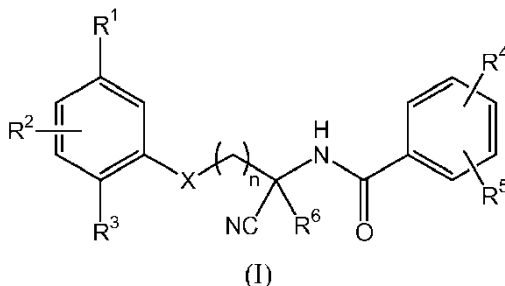
Preferentemente, la cinasa es una cinasa dependiente de ciclina, y más preferentemente, cdk₂ o cdk₄. El cáncer asociado a una cinasa se selecciona de entre cáncer ovárico, cáncer de mama, cáncer de colon, mesotelioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer de piel, glioma, liposarcoma, fibrosarcoma y leucemia.

Entre los cánceres de la descripción, pueden indicarse los siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, mesotelioma, riñón, hígado, pulmón, incluyendo el cáncer pulmonar de células pequeñas, el cáncer pulmonar de células no pequeñas, de cabeza y cuello, de esófago, de la vesícula biliar, de ovario, de páncreas, de estómago, de cervix, de tiroides, de próstata y de piel, incluyendo el carcinoma de células escamosas, tumores hematopoyéticos del linaje linfóide, incluyendo la leucemia, la leucemia linfocítica aguda, la leucemia linfoblástica aguda, el linfoma de células B, el linfoma de células T, el linfoma de Hodgkin, el linfoma no de Hodgkin, el linfoma de células pilosas, el linfoma de células del manto, el mieloma y el linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos del linaje mieloide, incluyendo las leucemias mielógenas agudas y crónicas, el síndrome mielodisplásico y la leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo el liposarcoma, GIST, el fibrosarcoma y el rabdomiosarcoma; tumores de los sistemas nerviosos central y periférico, incluyendo el astrocitoma, el neuroblastoma, el glioma y el schwannoma, y otros tumores, incluyendo el melanoma, el seminoma, el teratocarcinoma, el osteosarcoma, el xerodermia pigmentosa, el queratocantoma, el

cáncer folicular del tiroides y el sarcoma de Kaposi.

Preferentemente, el cáncer que debe tratarse se selecciona de entre cáncer de los ovarios, de mama, de próstata o el cáncer mesotelioma, y más preferentemente el cáncer que debe tratarse es cáncer de los ovarios.

En la presente descripción, se proporciona la utilización de un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de uno o más cánceres asociados a una cinasa:



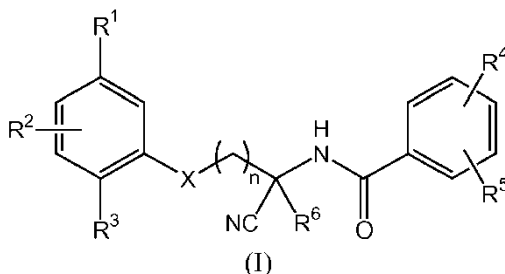
en el que:

R^1 , R^2 y R^3 y R^5 se seleccionan, cada uno independientemente, de entre H, alquilo, halógeno, $-CF_3$ o $-CN$,

R^4 y R^6 se seleccionan, cada uno independientemente, de H, alquilo, halógeno, alcoxi, $-CF_3$, $-OCF_3$, $-SO_2-CF_3$, $-SO-CF_3$ o $-S-CF_3$,

X es un heteroátomo, N(alquilo) o NH y
n es 1 a 20.

Se da a conocer además en la presente memoria, un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para la utilización en el tratamiento de uno o más cánceres asociados a una cinasa:



en el que:

R^1 , R^2 y R^3 y R^5 se seleccionan, cada uno independientemente, de entre H, alquilo, halógeno, $-CF_3$ o $-CN$,

R^4 y R^6 se seleccionan, cada uno independientemente, de entre H, alquilo, halógeno, alcoxi, $-CF_3$, $-OCF_3$, $-SO_2-CF_3$, $-SO-CF_3$ o $-S-CF_3$,

X es un heteroátomo, N(alquilo) o NH y
n es 1 a 20.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa la inhibición de la proliferación celular por MPL. Las estirpes celulares de cáncer ovárico OVCAR-3, A2780 y SKOV-3 y HUVEC (control) se cultivaron en presencia de MPL (0, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 μ moles/l) durante 72 horas. Se evaluó el efecto de MPL sobre la proliferación celular utilizando el ensayo de SRB. Las células de control (tratadas con vehículo) se consideró que presentaban una proliferación de 100% y los grupos tratados con MPL se expresaron como porcentaje del control. Se sometió a ensayo cada concentración de fármaco por cuadruplicado y se repitió cada experimento por lo menos dos veces. Los datos (medias $\pm$ SEM) se presentan como porcentaje respecto al control. Para las comparaciones estadísticas, cada grupo tratado con fármaco se comparó con el grupo de control utilizando una prueba t de

Student.

La figura 2 representa el efecto de MPL sobre la actividad de formación de colonias de las células OVCAR-3. Tras la incubación de las células con MPL (0, 5, 10 y 25 $\mu\text{moles/l}$) durante 72 horas, las células se lavaron, se transfirieron a placas de agar, se cultivaron con su medio de crecimiento habitual y se incubaron bajo condiciones estándares durante 2 semanas. A continuación, las células se fijaron con metanol al 100% y se tiñeron con cristal violeta al 1%. Se contaron las colonias (una agrupación de células superior a 50) bajo un microscopio (magnificación: $\times 5$). El número de colonias contadas para los diferentes grupos experimentales se expresa como porcentaje del control.

La figura 3 representa cómo MPL interfiere con la distribución del ciclo celular de las estirpes celulares de cáncer ovárico. Las células OVCAR-3 (figura 3a) o A2780 (figura 3b) se trataron con MPL (0, 5, 10 y 25 $\mu\text{moles/l}$) durante 48 horas. Las células teñidas con yoduro de propidio se analizaron para el contenido de ADN utilizando el análisis de citometría de flujo. Los resultados (ver la tabla) se muestran como porcentaje de células en las etapas G1, S y G2/M. Cada valor representa la media $\pm$ SEM de 2 experimentos independientes.

La figura 4 representa cómo 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 $\mu\text{moles/l}$) durante 48 horas. Los extractos de proteínas completas se obtuvieron y se separaron mediante electroforesis y se sondearon inmunotransferencias con los anticuerpos indicados. El análisis de transferencia western que mostraba los niveles de dichas proteínas en cada extracto se analizó utilizando los anticuerpos relevantes. La imagen representa la película radiográfica expuesta que se ha escaneado. El gen de mantenimiento (GAPDH) se utilizó para confirmar una carga de proteína y transferencia de la membrana similares.

La figura 5 representa un análisis de inmunotransferencia de PARP y PARP cortado en células tratadas con MPL. Las células OVCAR-3 y A2780 cultivadas bajo condiciones de cultivo celular se incubaron con diversas concentraciones de MPL (0, 5, 10, 25 μM) durante 24, 48 o 72 horas. A continuación, los lisados celulares se prepararon y se analizaron mediante transferencia western para la determinación de PARP y PARP cortado.

La figura 6 representa que el tratamiento de células de cáncer ovárico A2780 con MPL o de células de glioma U87 con MPL-SO₂ conduce a la formación de vacuolas, lo que sugiere que MPL y MPL-SO₂ inducen autofagia en dichas células.

La figura 7, consistente con la mostrada en la figura 6, muestra que el tratamiento de MPL reduce la proporción celular de ADP/ATP, que es otro indicador de autofagia celular.

La figura 8 representa la interferencia de MPL con la viabilidad celular. A) Imagen de microscopía de células OVCAR-3 expuestas a MPL (0, 5, 10 o 25 μM) durante 72 h. Las estirpes celulares de cáncer ovárico humano OVCAR-3, A2780, SKOV-3 y IGROV-1 se cultivaron en presencia de MPL (0, 5, 10 o 25 $\mu\text{moles/l}$) durante 72 h. Se evaluó el efecto de MPL sobre la viabilidad celular utilizando el ensayo de azul tripán estándar. Las células de control (tratadas con vehículo) se consideró que presentaban una proliferación de 100% y los grupos tratados con MPL se expresaron como porcentaje del control. Se sometió a ensayo cada concentración de fármaco por cuadruplicado y se repitió cada experimento por lo menos dos veces. Los datos (medias $\pm$ SEM) se presentan como % del control. Para las comparaciones estadísticas, cada grupo tratado con fármaco se comparó con el grupo de control utilizando una prueba t de Student y un valor de p de 0,05 o inferior se consideró que presentaba un cambio significativo ($p < 0,05$), $* = < 0,05$, $** = < 0,01$, $*** = p < 0,001$.

La figura 9 representa el efecto de MPL sobre la viabilidad de las células normales y muestra que el efecto antiproliferativo de MPL está orientado a las células de cáncer. Las células normales HOSE, CHO, HEK y HUVEC se cultivaron en presencia de MPL (0, 5, 10 o 25 $\mu\text{moles/l}$) durante 72 h. Se evaluó el efecto de MPL sobre la viabilidad celular utilizando el ensayo de azul tripán estándar. Los resultados se presentan como medias $\pm$ SEM en comparación con el control (100%).

La figura 1 representa cómo MPL inhibe la proliferación celular. Las estirpes celulares de cáncer ovárico humano OVCAR-3, A2780 y SKOV-3 y IGROV-1 se cultivaron todas en presencia de MPL (0, 5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{moles/l}$) durante 72 h. El efecto de MPL sobre la proliferación se evaluó utilizando el ensayo de SBR. Las células de control (tratadas con vehículo) se consideró que presentaban una proliferación de 100% y los grupos tratados con MPL se expresaron como porcentaje del control. Se sometió a ensayo cada concentración de fármaco por cuadruplicado y se repitió cada experimento por lo menos dos veces. Los datos (medias $\pm$ SEM) se presentan como % del control. Para las comparaciones estadísticas, cada grupo tratado con fármaco se comparó con el grupo de control utilizando una prueba t de Student. (A): Atropina: antagonista muscarínico de receptor de Ach.; Tobucorarina: antagonista nicotínico de receptor de Ach.; Mecamilamina: antagonista nicotínico de receptor no selectivo no competitivo; (B): Carbacol: agonista muscarínico nicotínico de receptor de Ach.; Nicotina: Agonista nicotínico de receptor de Ach.; alfa-bungarotoxina: agonista nicotínico de receptor de Ach. de tipo $\alpha 7$ selectivo.

La figura 11 representa que el efecto antiproliferativo de MPL es independiente de los receptores nicotínicos. Las células se pretrataron (30 min) con concentraciones crecientes de nicotina, carbacol o los antagonistas de receptor, atropina, mecamilamina, tubocurarina y α -bungarotoxina. Se añadió MPL (5 μ M) y se dejó en el incubador de cultivo celular durante 72 h. Se sometió a ensayo cada concentración de fármaco por cuadruplicado y se repitió cada experimento dos veces. Los valores combinados (medias $\pm$ SEM) se presentan como % del control.

La figura 12 representa cómo MPL inhibe la proliferación de las células de glioma. Comparación del efecto del tratamiento de MPL (0, 5, 10, 25, 50 μ M, 72 h) sobre la proliferación de las estirpes celulares de glioma U87-MG y U251 frente a astrocitos normales bajo condiciones de cultivo celular normales y utilizando un ensayo de proliferación con SBR. Los datos se presentan como % del control.

La figura 13 representa cómo MPL induce autofagia. El tratamiento de las células de glioma U87 quimiorresistentes con MPL conduce a autofagia, lo que se confirma por la expresión incrementada de LC3-II de una manera dependiente de la concentración. Las células de glioma U87-MG y U251 tratadas con MPL demuestran la formación dependiente de la concentración de autofagia (mostrada como vacuolas). La conversión dependiente de la concentración de LC3-I en LC3-II confirma el fenómeno creciente de autofagia en estas células.

La figura 14 representa el efecto de MPL sobre la actividad de formación de colonias de las células OVCAR-3 y A2780. Tras la incubación de las células con MPL (0, 5, 10 y 25 μ M) durante 72 horas, las células se lavaron, se transfirieron a placas de agar, se cultivaron con su medio de crecimiento habitual y se incubaron bajo condiciones estándares durante 2 semanas. A continuación, las células se fijaron con metanol al 100% y se tiñeron con cristal violeta al 1%. Se contaron las colonias (una agrupación de células superior a 50) bajo un microscopio (magnificación: x5). El número de colonias contadas para los diferentes grupos experimentales se expresa como % del control.

La figura 15 representa cómo MPL interfiere con la progresión del ciclo celular de las estirpes celulares de cáncer ovárico. Las células OVCAR-3 o A2780 fueron tratadas con MPL (0, 5, 10 o 25 μ M) durante 48 h y se examinaron mediante análisis de citometría de flujo (FACS) tras la tinción de las células con PI. La figura y los datos presentan los cambios inducidos por MPL en la distribución celular en diversas etapas del ciclo celular; se muestra como porcentaje de células en las etapas G1, S y G2/M. Cada valor representa la media $\pm$ SEM de 2 determinaciones independientes.

La figura 16 representa cómo 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 μ M). Se obtuvieron extractos de proteínas completas y se separaron mediante electroforesis y se sondearon inmunotransferencias con los anticuerpos indicados. El análisis de transferencia western que mostraba los niveles de dichas proteínas en cada extracto se analizó utilizando los anticuerpos relevantes. La imagen representa la película radiográfica expuesta que se ha escaneado. El gen de mantenimiento (GAPDH) se utilizó para confirmar una carga de proteína y transferencia de la membrana similares.

La figura 17 representa cómo MPL corta la PARP. La exposición de las células OVCAR-3 o A2780 a MPL (0, 5, 10 o 25 μ M) durante 24, 48 o 72 h causa el corte de PARP, que conduce al desensamblaje celular y sirve como marcador de células moribundas.

Las figuras 18A y 18B representan cómo MPL reduce los niveles de ATP. La exposición de las células OVCAR-3 o A2780 a MPL (0, 5, 10 o 25 μ M) durante 24, 48 o 72 h causa el corte de PARP, que conduce al desensamblaje celular y sirve como marcador de células moribundas.

La figura 19 representa el efecto de la inyección i.p. (Intraperitoneal) de monepantel en el crecimiento tumoral s.c. (Subcutáneo) en ratones desnudos. Se inyectaron 2,5 millones de células OVCAR3 en crecimiento en fase logarítmica s.c. en el flanco izquierdo de cada ratón. Se monitorizó el crecimiento tumoral mediante mediciones con calibre y se determinaron los volúmenes tumorales mediante la medición de los diámetros ortogonales. Se calculó el volumen tumoral estimado basándose en la fórmula $1/2 (\text{Longitud} \times \text{Anchura}^2)$, en donde la anchura es la más corta de las dos mediciones ortogonales. Se inició el tratamiento 7 días después de la inyección de células tumorales, antes de la cual, los ratones habían sido asignados aleatoriamente al tratamiento o al grupo de control (6 en cada grupo). Se administró monepantel suspendido en HPMC al 0,5%, i.p. a dosis de 2,5 o 25 mg/kg tres veces a la semana. El grupo de control se trató con vehículo solo.

La figura 20 representa el efecto de monepantel administrado i.p. sobre el crecimiento tumoral s.c. en ratones desnudos. Se inyectaron células OVCAR-3 en crecimiento en fase logarítmica s.c. en el flanco izquierdo de cada ratón. Se monitorizó el crecimiento tumoral mediante mediciones con calibre y se determinaron los volúmenes tumorales mediante la medición de los diámetros ortogonales. Se calculó el volumen tumoral estimado basándose en la fórmula $1/2 (\text{Longitud} \times \text{Anchura}^2)$, en donde la anchura es la más corta de las dos

mediciones ortogonales. Se inició el tratamiento 7 días después de la inyección de células tumorales, antes de la cual, los ratones habían sido asignados aleatoriamente al tratamiento o al grupo de control (6 en cada grupo). Se administró monepantel suspendido en HPMC al 0,5%, i.p. a dosis de 25 o 50 mg/kg tres veces a la semana. El grupo de control se trató con vehículo solo.

La figura 21 representa el efecto de monepantel oral sobre el crecimiento tumoral en ratones desnudos. Se inyectaron células OVCAR-3 s.c. en el flanco izquierdo de cada ratón. Se monitorizó el crecimiento tumoral mediante mediciones con calibrador y se determinaron los volúmenes tumorales a partir de los diámetros ortogonales y se calculó el volumen tumoral estimado basándose en la fórmula $1/2 (\text{Longitud} \times \text{Anchura}^2)$, en donde la anchura es la más corta de las dos mediciones ortogonales. Se inició el tratamiento 7 días después de la inyección de células tumorales, antes de la cual, los ratones habían sido asignados aleatoriamente al tratamiento o al grupo de control (6 en cada grupo). Se administró monepantel suspendido en HPMC al 0,5%, oralmente (100 µl) a una dosis de 50 o 100 mg/kg tres veces a la semana. El grupo de control se trató por vía oral con vehículo solo.

Las figuras 19 a 21 en general representan el efecto del MPL sobre xenoinjertos s.c. en ratones desnudos hembra. Los ratones fueron inoculados en el flanco izquierdo con 2,5 millones de células OVCAR-3 humanas en fase logarítmica de crecimiento. Se monitorizó el crecimiento tumoral mediante mediciones con calibrador y se determinaron los volúmenes tumorales mediante la medición de los diámetros ortogonales. Se calculó el volumen tumoral estimado basándose en la fórmula $1/2 (\text{Longitud} \times \text{Anchura}^2)$, en donde la anchura es la más corta de las dos mediciones ortogonales. Se inició el tratamiento 7 días después de la inyección de células tumorales, antes de la cual, los ratones habían sido asignados aleatoriamente a tratamiento o al grupo de control (5-6 en cada grupo). Se administró i.p. monepantel en HPMC al 0,5% a una dosis de 2,5 o 25 mg/kg (figura 19), 25 y 50 mg/kg (figura 20) o por vía oral a una dosis de 50 y 100 mg/kg, todas administradas tres veces a la semana. Los ratones del grupo de control recibieron un volumen similar de HPMC al 0,5% de una manera y tiempo exactamente similares.

La figura 22 representa cómo MPL induce necrosis en los tejidos tumorales. El tejido tumoral de xenoinjertos subcutáneos en ratones desnudos se trató con MPL administrado por vía oral en días alternos a una dosis de 50 o 100 mg/kg/día. Se muestran imágenes histológicas de tumores con tinción de hematoxilina-eosina (H-E, fila superior); indicando una profunda necrosis inducida por el fármaco (cabeza de flecha negra; magnificación: x10). Una imagen representativa de la histología tumoral de los tumores extirpados de ratones tratados con MPL que demuestran necrosis extensa a la dosis más alta, de 100 mg/kg (en el tumor s.c., tratamiento oral x3 a la semana durante 2 semanas).

Definiciones

El término "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo, en particular flúor o cloro.

El término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático que puede ser lineal o ramificado y que comprende entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquilo preferentes contienen entre aproximadamente 1 y aproximadamente 12 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquilo preferentes contienen entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 átomos de carbono en la cadena. El término ramificado se refiere a que uno o más grupos de alquilo inferior, tales como metilo, etilo o propilo, se encuentra unido a una cadena de alquilo lineal. La expresión "alquilo inferior" se refiere a un grupo que presenta entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 átomos de carbono en la cadena que puede ser lineal o ramificada. El "alquilo" puede estar no sustituido u opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes, seleccionando cada sustituyente de manera independiente de entre el grupo que consiste en halo, alquilo, arilo, cicloalquilo, ciano, hidroxilo, alcoxi, alquiltio, amino, -NH(alquilo), -NH(cicloalquilo), -N(alquilo)₂, carboxi y -C(O)O-alquilo. Entre los ejemplos no limitativos de grupos alquilo adecuados se incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y t-butilo.

El término "heteroátomo" se refiere a un átomo seleccionado de entre N, O, P y S. En caso necesario, cualquier valencia no designada se selecciona independientemente de entre H, OH, carbonilo, n-alquilo o alcoxi.

"n" puede ser 1 a 20, preferentemente 1 a 10, más preferentemente 1 a 6 y lo más preferentemente 1 a 4.

El término "alcoxi" se refiere a un grupo alquil-O- en el que el grupo alquilo es tal como se ha indicado anteriormente. Entre los ejemplos no limitativos de grupos alcoxi adecuados se incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi y n-butoxi. El enlace a la fracción parental es mediante el oxígeno del éter.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de adición de ácido o sales de adición de base convencionales que conservan la eficacia y propiedades biológicas de los compuestos de fórmula (I) y se forman a partir de ácidos o bases orgánicos o inorgánicos no tóxicos adecuados. Entre las sales de adición de ácido de muestra se incluyen aquellos derivados de ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido fosfórico y ácido nítrico, y aquellos 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 similares. Entre las sales de adición de base de muestra se incluyen aquéllas 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, un fármaco) para formar una sal es una técnica bien conocida por los químicos farmacéuticos para obtener mejores estabilidad física y química, higroscopicidad, capacidad de flujo y solubilidad de los compuestos. Ver, por ejemplo, H. Ansel *et al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (6a ed., 1995) en las páginas 196 y 1.456 a 1.457.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", tal como portador, excipiente, etc. farmacéuticamente aceptable, se refiere a que resulta farmacológicamente aceptable y sustancialmente no tóxico para el sujeto en el que se administra el compuesto particular.

El término "sustituido", tal como en alquilo sustituido, se refiere a que la sustitución puede producirse en una o más posiciones y, a menos que se indique lo contrario, que los sustituyentes en cada sitio de sustitución se seleccionan independientemente de entre las opciones especificadas, es decir, puede encontrarse presente más de un sustituyente simultáneamente en diversos sitios.

Los "solvatos" de los compuestos de la invención también se encuentran contemplados en la presente memoria.

Los compuestos de fórmula (I) pueden contener centros asimétricos o quirales, y, por lo tanto, existen en diferentes formas estereoisoméricas. Se pretende que todas las formas estereoisoméricas de los compuestos de la fórmula (I), así como mezclas de los mismos, incluyendo mezclas racémicas, forman parte de la presente invención. Además, la presente invención comprende todos los isómeros geométricos y posicionales. Las mezclas diastereoméricas pueden separarse en sus diastereómeros individuales basándose en sus diferencias fisicoquímicas mediante métodos bien conocidos por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, la cromatografía y/o la cristalización fraccionada. Los enantiómeros pueden separarse mediante la conversión de la mezcla enantiomérica en una mezcla diastereomérica mediante reacción con un compuesto ópticamente activo apropiado (por ejemplo, un auxiliar quiral, tal como un alcohol quiral o cloruro de ácido de Mosher), la separación de los diastereómeros y la conversión (por ejemplo, la hidrólisis) de los diastereómeros individuales en los enantiómeros puros correspondientes. Los enantiómeros también pueden separarse mediante la utilización de una columna de HPLC quiral. Los centros quirales de la presente invención pueden presentar la configuración S o R tal como se definió en la IUPAC 1974.

La utilización de los términos "sal" o "solvato" y similares pretende aplicarse igualmente a la sal y solvato de los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, isómeros posicionales y racematos de los compuestos de la invención.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "que comprende" se refiere a "que incluye". Las variaciones de la expresión "que comprende", tal como "comprende" correspondientemente presentan significados variados. De esta manera, por ejemplo, una composición farmacéutica "que comprende" un compuesto de fórmula (I) puede consistir exclusivamente de dicho compuesto o puede incluir uno o más componentes adicionales (por ejemplo, un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "pluralidad" se refiere a más de uno. En determinados aspectos o realizaciones específicos, 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 en los mismos, y cualquier intervalo derivado de los mismos.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de por lo menos un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que inhibe sustancialmente la proliferación y/o evita la diferenciación de una célula tumoral humana, incluyendo las estirpes celulares tumorales humanas. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se utiliza en la presente memoria incluye en su significado una cantidad no tóxica aunque suficiente de un agente o composición para la utilización en la presente invención para proporcionar el efecto terapéutico deseado. La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto dependiendo de factores tales como la especie bajo tratamiento, la edad y la condición general del sujeto, la gravedad de la condición bajo tratamiento, el agente particular que se administra, el modo de administración y similares. De esta manera, no resulta posible especificar una "cantidad eficaz" exacta aplicable a todas las realizaciones. Sin embargo, para cualquier caso dado, el experto ordinario en la materia puede determinar una "cantidad eficaz" apropiada utilizando únicamente experimentación rutinaria.

Descripción detallada

5

Esquema 1:



Esquema 2:



Los AAD son una clase de compuestos químicos que han sido utilizados anteriormente para tratar los nematodos farmacoresistentes. El compuesto, MPL, es un ejemplo de uno de dichos AAD con diana en receptores nicotínicos de acetilcolina en nematodos y se ha utilizado ampliamente para el tratamiento de parásitos en rumiantes.

20

25

a andrógenos. De manera similar, la replicación de las células PET y YOU (mesotelioma) y de las células U87 (glioblastoma), que también son altamente resistentes a la quimioterapia, resulta profundamente suprimida por MPL.

5 Sin respaldo teórico, resulta inesperado que, al contrario que el modo de acción observado en nematodos, los compuestos de fórmula (I) pueden actuar utilizando como diana las cinasas dependientes de ciclina en las estirpes celulares de cáncer. Más específicamente, los compuestos de fórmula (I) aparentemente interfieren con las cinasas reguladoras del ciclo celular, tales como la cinasa 2 dependiente de ciclina (Cdk₂) y la cinasa 4 dependiente de ciclina (Cdk₄).

10 El tratamiento de las estirpes celulares de cáncer con compuestos de fórmula (I), tales como MPL y MPL-SO₂, aparentemente resulta en la parada del ciclo celular. Nuevamente sin respaldo teórico, aparentemente el tratamiento puede inducir una parada del ciclo celular en G1, tal como pone de manifiesto la acumulación de células en la etapa G1 del ciclo celular. Además, se sugiere que el tratamiento de las estirpes celulares de cáncer con compuestos de fórmula (I), tal como MPL y MPL-SO₂, podría inducir una parada del ciclo celular en Gn irreversible, tal como pone de manifiesto las células que salen del ciclo celular y sometidas a autofagia y/o apoptosis. Esta nueva clase de agentes antihelmínticos puede presentar un perfil mecánico diferente que los benzimidazoles, ofreciendo un nuevo enfoque mejorado a la terapia del cáncer.

20 Composiciones, medicamentos y kits

La presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas, medicamentos y kits que comprenden por lo menos un compuesto de fórmula (I), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto y por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable. Para preparar composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos descritos por la presente invención, los portadores farmacéuticamente aceptables inertes pueden ser sólidos o líquidos. Entre las preparaciones en forma sólida se incluyen polvos, comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, obleas y supositorios. Los polvos y comprimidos pueden comprender entre aproximadamente 5 y aproximadamente 95 por ciento de principio activo. Los portadores sólidos adecuados son conocidos de la técnica, por ejemplo el carbonato de magnesio, el estearato de magnesio, el talco, el azúcar o la lactosa. Los comprimidos, polvos, obleas y cápsulas pueden utilizarse como formas de administración sólida adecuadas para la administración oral. Pueden encontrarse ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables y métodos de preparación para diversas composiciones en A. Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a edición, (1990), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania.

Entre las preparaciones de forma líquidas se incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo agua o soluciones de agua-propilenglicol para la inyección parenteral o la adición de edulcorantes y opacificadores para soluciones, suspensiones y emulsiones orales. Entre las preparaciones de forma líquida pueden incluirse además soluciones para la administración intranasal.

Entre las preparaciones de aerosol adecuadas para la inhalación pueden incluirse soluciones y sólidos en forma de polvos, que pueden encontrarse en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como un gas comprimido inerte, por ejemplo nitrógeno. También se incluyen preparaciones en forma sólida que están destinadas a la conversión, poco antes de la utilización, a preparaciones en forma líquida, para la administración oral o parenteral. Entre dichas formas líquidas se incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

Los compuestos de la invención también pueden formularse para la administración transdérmica. Las composiciones transdérmicas pueden adoptar la forma de cremas, lociones, aerosoles y/o emulsiones y pueden incluirse en un parche transdérmico de tipo matriz o reservorio, convencionales en la técnica para este fin.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse por vía subcutánea.

Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) se administra por vía oral.

Las composiciones y medicamentos de la presente descripción pueden comprender un portador, adyuvante, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los portadores, diluyentes, excipientes y adyuvantes deben ser "aceptables" en términos de ser compatibles con los demás ingredientes de la composición o medicamento y generalmente no resultan perjudiciales para el receptor de los mismos. Son ejemplos no limitativos de portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, el agua desmineralizada o destilada, solución salina, aceites de origen vegetal, tales como el aceite de cacahuete, el aceite de cártamo, el aceite de oliva, el aceite de semilla de algodón, el aceite de maíz, el aceite de sésamo, aceites tales como el aceite de cacahuete, el aceite de cártamo, el aceite de oliva, el aceite de semilla de algodón, el aceite de maíz, el aceite de sésamo, el aceite de arachis o el aceite de coco; aceites de silicona, incluyendo polisiloxanos, tales como metilpolisiloxano, fenilpolisiloxano y metilfenilpolisiloxano; siliconas volátiles; aceites minerales, tales como parafina líquida, parafina blanda o escualano; derivados de celulosa, tales como metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica o hidroxipropilmetil-celulosa; alcoholes inferiores, por ejemplo etanol o isopropanol; aralcoholes inferiores; polialquilenglicoles inferiores o alquilenglicoles inferiores, por

ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol, etilglicol, 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 gelatina de petróleo. Típicamente, el portador o portadores formarán entre aproximadamente 10% y aproximadamente 99,9% en peso de la composición o medicamento.

La composición y medicamentos de la presente descripción pueden encontrarse en una forma adecuada para la administración mediante inyección (por ejemplo para la administración parenteral, incluyendo la inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa), mediante administración oral (tal como cápsulas, comprimidos, pastillas y elixires, por ejemplo), mediante administración tópica (por ejemplo en forma de una pomada, crema o loción, o una forma adecuada para la administración en forma de una gotas oculares) o mediante inhalación intranasal (por ejemplo en forma de aerosoles).

Para la administración en forma de solución o suspensión inyectable, entre los diluyentes o portadores parenteralmente aceptables no tóxicos pueden incluirse solución de Ringer, solución salina isotónica, solución salina tamponada con fosfato, etanol y 1,2-propilenglicol. Los métodos para preparar composiciones y medicamentos administrables por vía parenteral resultan evidentes para el experto ordinario en la materia y se describen en mayor detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 15a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa.

Para la administración oral, entre algunos ejemplos de portadores, diluyentes, excipientes y adyuvantes adecuados se incluyen aceite de cacahuete, parafina líquida, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, alginato sódico, goma acacia, goma tragacanto, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, gelatina y lecitina. Además, dichas formulaciones orales pueden contener agentes saborizantes y colorantes adecuados. Al utilizarse en forma de cápsula, las cápsulas pueden recubrirse con compuestos tales como el monoestearato de glicerilo o el estearato de glicerol, los cuales retrasan la degradación. Entre los adyuvantes típicamente se incluyen emolientes, emulsionantes, agentes espesantes, conservantes, bactericidas y agentes tamponadores.

Las formas sólidas para la administración oral pueden contener ligantes aceptables en la práctica farmacéutica humana y veterinaria, edulcorantes, agentes desintegrantes, diluyentes, saborizantes, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes de retardo temporal. Entre los ligantes adecuados se incluyen goma acacia, gelatina, almidón de maíz, goma tragacanto, alginato sódico, carboximetilcelulosa o polietilenglicol. Entre los edulcorantes adecuados se incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Entre los agentes desintegrantes adecuados se incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma guar, goma xantana, bentonita, ácido alginico o agar. Entre los diluyentes adecuados se incluyen lactosa, sorbitol, manitol, dextrosa, caolín, celulosa, carbonato de calcio, silicato de calcio o fosfato de dicalcio. Entre los agentes saborizantes adecuados se incluyen aceite de menta, aceite de gaulteria, saborizante de cereza, naranja o frambuesa. Entre los agentes de recubrimiento adecuados se incluyen polímeros o copolímeros de ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras, alcoholes grasos, ceína, shellac o gluten. Entre los conservantes adecuados se incluyen benzoato sódico, vitamina E, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno o bisulfito sódico. Entre los lubricantes adecuados se incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato sódico, cloruro sódico o talco. Entre los agentes de retardo temporal adecuados se incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las formas líquidas para la administración oral pueden contener, además de los agentes anteriormente indicados, un portador líquido. Entre los portadores líquidos adecuados se incluye agua, aceites tales como el aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de aráquis, aceite de coco, parafina líquida, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, etanol, propanol, isopropanol, glicerol, alcoholes grasos, triglicéridos o mezclas de los mismos.

Las suspensiones para la administración oral pueden comprender además agentes dispersantes y/o agentes de suspensión. Entre los agentes de suspensión adecuados se incluyen carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, polivinilpirrolidona, alginato sódico o alcohol acetílico. Entre los agentes dispersantes adecuados se incluyen lecitina, ésteres de polioxietileno de ácidos grasos tales como ácido esteárico, mono- o di-oleato, -estearato o -laurato de polioxietilén-sorbitol, mono- o di-oleato, -estearato o -laurato de polioxietilén-sorbitano y similares.

Las formulaciones para la administración oral pueden comprender uno o más agentes emulsionantes. Entre los agentes emulsionantes adecuados se incluyen agentes dispersantes tal como se ejemplifica anteriormente o gomas naturales, tales como goma guar, goma acacia o goma tragacanto.

Las formulaciones tópicas de la presente descripción pueden comprender un principio activo junto con uno o más portadores aceptables, y opcionalmente cualesquiera otros ingredientes terapéuticos. Entre las formulaciones adecuadas para la administración tópica se incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas adecuadas para la penetración a través de la piel en el sitio en que resultaba necesario el tratamiento, tal como linimentos, lociones, cremas, pomadas o pastas, y gotas adecuadas para la administración en el ojo, oído o nariz.

Las gotas según la presente descripción pueden comprender soluciones o suspensiones acuosas o aceitosas estériles. Estas pueden prepararse mediante la disolución del principio activo en una solución acuosa de un agente bactericida y/o fungicida y/o cualquier otro conservante adecuado, y que opcionalmente incluye un agente activo en superficie. La solución resultante seguidamente puede clarificarse mediante filtración, transferirse a un recipiente adecuado y esterilizarse. La esterilización puede llevarse a cabo mediante autoclavado o el mantenimiento a 90°C-100°C durante media hora, o mediante filtración, seguido de la transferencia a un recipiente mediante una técnica aséptica. Son ejemplos de agentes bactericidas y fungicidas adecuados para la inclusión en las gotas, el nitrato o acetato fenilmercúrico (0,002%), el cloruro de benzalconio (0,01%) y el acetato de clorhexidina (0,01%). Entre los solventes adecuados para la preparación de una solución aceitosa se incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.

Entre las lociones según la presente descripción se incluyen las adecuadas para la aplicación en la piel o en el ojo. Una loción ocular puede comprender una solución acuosa estéril que contiene opcionalmente un bactericida y puede prepararse mediante métodos similares a los descritos anteriormente en relación a la preparación de gotas. Entre las lociones o linimentos para la aplicación en la piel pueden incluirse además un agente para acelerar el secado y para enfriar la piel, tal como un alcohol o acetona, y/o un hidratante, tal como glicerol, o aceite, tal como aceite de ricino o aceite de araquís.

Las cremas, pomadas o pastas según la presente descripción son formulaciones semisólidas del principio activo para la aplicación externa. Pueden prepararse mediante la mezcla del principio activo en forma finamente dividida o de polvos, solo o en solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, con una base grasa o no grasa. La base puede comprender hidrocarburos, tales como parafina dura, blanda o líquida, glicerol, acera de abeja, un jabón metálico, un mucílago, un aceite de origen natural, tal como aceite de almendra, maíz, araquís, ricino u oliva, grasa de lana o sus derivados, o un ácido graso, tal como ácido esteárico u oleico junto con un alcohol, tal como propilenglicol o macrogols.

Las composiciones y medicamentos de la presente descripción pueden incorporar cualquier surfactante adecuado, tal como un surfactante aniónico, catiónico o no iónico, tal como ésteres de sorbitano o derivados polioxietileno de los mismos. También pueden incluirse agentes de suspensión, tales como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos, tales como sílices síliceas, y otros ingredientes, tales como lanolina.

Las composiciones y medicamentos de la presente descripción pueden administrarse en forma de un liposoma. Los métodos adecuados para formar liposomas son conocidos de la técnica y en relación a ello se hace referencia específica a Prescott, (Ed), "Methods in Cell Biology", volumen XIV, Academic Press, New York, N.Y., 1976, página 33 y siguientes.

También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones y medicamentos de la presente descripción, tales como adyuvantes o modificadores de la respuesta biológica.

Puede incluirse cualquier adyuvante adecuado en las composiciones y medicamentos de la presente descripción. Por ejemplo, puede utilizarse un adyuvante basado en aluminio. Entre los adyuvantes basados en aluminio adecuados se incluyen, aunque sin limitación, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y combinaciones de los mismos. Otros ejemplos específicos de adyuvantes basados en aluminio que pueden utilizarse se describen en la patente europea nº 1216053 y en la patente US nº 6.372.223. Entre otros adyuvantes adecuados se incluyen adyuvante incompleto y adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Mich.); Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.); sales de aluminio, tales como gel de hidróxido de aluminio (alúmina) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o cinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares aciladas; polisacáridos derivados catiónica o aniónicamente; polifosfacenos; microesferas biodegradables; monofosforil lípido A y quil A; aceite en emulsiones acuosas, incluyendo las indicadas en la patente europea nº 0399843, patente US nº 7.029.678 y la publicación de patente PCT nº WO 2007/006939, y/o citoquinas adicionales, tales como GM-CSF o interleucina-2, -7, o -12, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), monofosforil-lípido A (MPL), toxina del cólera (TC) o su subunidad constituyente, enterotoxina lábil al calor (LT) o su subunidad constituyente, adyuvantes de ligando de receptor de tipo Toll, tal como lipopolisacárido (LPS) y derivados del mismo (por ejemplo monofosforil-lípido A y monofosforil-lípido A 3-desacilado), dipéptido muramilo (MPD) y proteína F del virus sincitial respiratorio (VSR).

La presente descripción da a conocer un kit que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de por lo menos un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto y un portador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción da a conocer un kit que comprende una cantidad de por lo menos un compuesto de fórmula (I) o sal o solvato farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto y una cantidad de por lo menos una terapia anticancerosa y/o agente anticanceroso indicado anteriormente, en el que las cantidades de los dos o más ingredientes resulta en un efecto terapéutico deseado.

Los kits de la presente descripción pueden comprender componentes para ayudar a llevar a cabo los métodos de la presente invención, tales como, por ejemplo, uno o más dispositivos de administración, uno o más tampones y/o uno o más diluyentes. Los kits pueden incluir recipientes para alojar los diversos componentes e instrucciones para utilizar los componentes de kit en los métodos de la presente invención.

Los kits pueden ser kits combinados. Los kits pueden ser kits fragmentados.

Dosis y vías de administración.

Los agentes, composiciones y medicamentos pueden administrarse en un receptor por vías estándares, incluyendo, aunque sin limitación, parenteral (por ejemplo las vías intravenosa, intraespinal, subcutánea o intramuscular), oral, tópica o mucosal (por ejemplo intranasal). En algunas realizaciones, pueden administrarse en un receptor aisladamente o en combinación con otro agente o agentes terapéuticos adicionales. En dichas realizaciones, la administración puede ser simultánea o secuencial.

En general, los agentes, composiciones y medicamentos pueden administrarse de una manera compatible con la vía de administración y las características físicas del receptor (incluyendo el estado de salud) y de manera que se induzcan el efecto o efectos deseados (es decir, que resulte terapéuticamente eficaz, inmunógeno y/o protector). Por ejemplo, la dosis apropiada puede depender de una diversidad de factores, incluyendo, aunque sin limitación, las características físicas de un sujeto (por ejemplo, la edad, el peso, el sexo), si el agente, composición o medicamento se utiliza como terapia de agente individual o adyuvante, la progresión (es decir, el estado patológico) del cáncer bajo tratamiento y otros factores fácilmente evidentes para el experto ordinario en la materia.

Se describen diversas consideraciones generales al determinar una dosis apropiada de los agentes, composiciones y medicamentos en, por ejemplo, Gennaro *et al.* (Eds.), "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, USA, 1990, y Gilman *et al.*, (eds.), "Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics", Pergamon Press, 1990.

Una ventaja inesperada de la presente invención es que los compuestos de fórmula (I) generalmente reflejan una baja toxicidad. Por ejemplo, MPL presenta toxicidad en una sola dosis de más de 2.000 mg por kg de peso corporal. De esta manera, un agente, composición o medicamento para la utilización en la presente invención puede administrarse en un paciente en forma de una sola dosis de una cantidad de hasta 2.000 mg, inclusive, de uno o más componentes activos por kg de peso corporal. Además, otra ventaja inesperada de la presente invención es la tolerancia clínica generalmente elevada de los compuestos de fórmula (I). Por ejemplo, una dosis de 1.000 mg de MPL por kg de peso corporal por cada 24 horas resulta bien tolerada en los mamíferos. De esta manera, un agente, composición o medicamento para la utilización en la presente invención puede administrarse en un paciente en una cantidad de hasta 1000 mg, inclusive, de uno o más componentes activos por kg de peso corporal cada 24 horas.

Generalmente, una dosis eficaz se espera que se encuentre comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,0001 mg y aproximadamente 1.000 mg del componente o componentes activos por kg de peso corporal cada 24 horas; típicamente entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 750 mg por kg de peso corporal cada 24 horas; entre aproximadamente 0,01 mg y aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal cada 24 horas; entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal cada 24 horas; entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal cada 24 horas, o entre aproximadamente 1,0 mg y aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal cada 24 horas. Más típicamente, una dosis eficaz se espera que se encuentre comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 1,0 mg y aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal cada 24 horas, entre aproximadamente 1,0 mg y aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal cada 24 horas; entre aproximadamente 1,0 mg y aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal cada 24 horas; entre aproximadamente 1,0 mg y aproximadamente 25 mg por kg de peso corporal cada 24 horas; entre aproximadamente 5,0 mg y aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal cada 24 horas, entre aproximadamente 5,0 mg y aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal cada 24 horas, o entre aproximadamente 5,0 mg y aproximadamente 15 mg por kg de peso corporal cada 24 horas.

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

Típicamente, en aplicaciones de tratamiento, el tratamiento puede prolongarse durante la duración completa del cáncer. Además, resultará evidente para el experto ordinario en la materia que la cantidad y espaciado óptimos de las dosis individuales pueden determinarse a partir de la naturaleza y la extensión del estado o condición de enfermedad bajo tratamiento, la forma, vía o sitio de administración y la naturaleza del sujeto particular bajo tratamiento. Las dosis óptimas pueden determinarse utilizando técnicas convencionales.

En muchos casos (por ejemplo, aplicaciones preventivas), puede resultar deseable realizar varias o múltiples administraciones de un agente, composición o medicamento de la presente invención que puede, por ejemplo, administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces. Las administraciones pueden realizarse a intervalos de entre aproximadamente una y aproximadamente doce semanas, y en determinadas realizaciones, en intervalos de entre aproximadamente una y aproximadamente cuatro semanas. La readministración periódica también se encuentra contemplada.

También resultará evidente para el experto ordinario en la materia que pueda determinarse el curso óptimo de administración utilizando ensayos de determinación de curso convencional de tratamiento.

En el caso de que se administren dos o más entidades (por ejemplo, agentes o medicamentos) en un sujeto "conjuntamente", pueden administrarse en una única composición simultáneamente, o en composiciones separadas simultáneamente o en composiciones separadas de manera separada en el tiempo.

Determinados aspectos de la presente descripción implican la administración de los agentes, composiciones o medicamentos en múltiples dosis separadas. De acuerdo con lo anterior, los métodos para el tratamiento profiláctico o terapéutico descrito en la presente memoria comprenden la administración de múltiples dosis separadas en un sujeto, por ejemplo durante un periodo de tiempo definido. De acuerdo con lo anterior, en algunos aspectos, los métodos incluyen la administración de una dosis de cebado, a la que puede seguir una dosis de refuerzo. El refuerzo puede ser para el propósito de la revacunación. En diversas realizaciones, el agente, composición o medicamento se administra por lo menos una vez, dos veces, tres veces o más.

Los agentes, composiciones y medicamentos pueden administrarse de manera general en una cantidad eficaz para conseguir un propósito deseado. Más específicamente, pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz, que significa una cantidad eficaz para evitar el desarrollo o aliviar los síntomas existentes de una enfermedad o condición diana. La determinación de cantidades eficaces se encuentra perfectamente dentro de la capacidad del experto ordinario en la materia. Por ejemplo, una dosis terapéuticamente eficaz de los agentes, composiciones y medicamentos puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la IC_{50} determinada en cultivo celular. Dicha información puede utilizarse para determinar más exactamente las dosis útiles en el ser humano y en otros sujetos de mamífero.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad del agente, composición o medicamento para evitar el desarrollo de síntomas, mejorar síntomas y/o prolongar la supervivencia del sujeto bajo tratamiento. La toxicidad y eficacia terapéutica de los agentes, composiciones y medicamentos puede determinarse mediante ensayos farmacéuticos estándares en cultivo celular y/o en animales experimentales (por ejemplo, mediante la determinación de la LD_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población)). La proporción de dosis entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico, que puede expresarse como la proporción entre LD_{50} y ED_{50} . Resultan preferentes los agentes, composiciones y medicamentos que muestran índices terapéuticos elevados. Los datos obtenidos de dichos ensayos de cultivo celular y/o de estudios animales pueden utilizarse para formular un intervalo de dosis adecuado para la utilización en el ser humano o en otros mamíferos. La dosis de dichos compuestos se encuentra preferentemente comprendida dentro del intervalo de concentraciones circulantes que incluye la ED_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de dicho intervalo, dependiendo de la forma de administración empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación, vía de administración y dosis exactas las puede seleccionar sin dificultad un médico individual en vista de la condición del sujeto (ver, por ejemplo, Fingl *et al.*, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cap. 1, página 1, 1975). La cantidad e intervalo de las dosis pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del agente activo suficientes para conseguir y mantener los efectos terapéuticos deseados y/o una concentración eficaz mínima (CEM). Las dosis necesarias para conseguir la CEM dependerán de la vía de administración y de otras características individuales. Pueden utilizarse bioensayos y/o ensayos de HPLC para determinar las concentraciones plasmáticas.

Los intervalos de dosis también pueden determinarse utilizando el valor de CEM. En general, los agentes, composiciones y medicamentos pueden administrarse utilizando un régimen que mantiene los niveles plasmáticos sobre el CEM durante aproximadamente 10% a 90% del tiempo, preferentemente entre 30% a 90% y más preferentemente entre aproximadamente 50% a 90%. En formas de realización en las que se utiliza la administración local o la incorporación selectiva, la concentración local eficaz del fármaco puede no estar relacionada con la concentración plasmática.

Los compuestos de la presente invención también pueden resultar útiles en combinación (administrados juntos o secuencialmente) con uno o más tratamientos anticancerosos, tales como la terapia de radiación, y/o uno o más agentes anticancerosos seleccionados de entre el grupo que consiste en agentes citostáticos, agentes citotóxicos (tales como, por ejemplo, aunque sin limitación, agentes de interacción con el ADN (tales como el cisplatino o la doxorubicina), taxanos (por ejemplo, taxotere y taxol), inhibidores de la topoisomerasa II (tales

como el etopósido), inhibidores de la topoisomerasa I (tales como el irinotecán (o CPT-11), el camptostar o el topotecán), agentes de interacción con la tubulina (tales como el paclitaxel, el docetaxel o los epotilones), agentes hormonales (tales como el tamoxifeno), inhibidores de la timidilato sintasa (tales como el 5-fluorouracilo), antimetabolitos (tales como el metotrexato), agentes alquilantes (tales como la temozolamida (TEMODARTM) de Schering-Plough Corporation, Kenilworth, New Jersey) y la ciclofosfamida), los inhibidores de la proteína farnesilo transferasa (tales como SARASARTM) [2-[4-[(11 R)-3,10-dibromo-8-cloro-6,11-dihidro-5H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridín-11-il]-1-piperidinil]-2-oxoetil]-1-piperidincarboxamida o SCH 66336 de Schering-Plough Corporation, Kenilworth, New Jersey), tipifamib (Zamestra® o R115777 de Janssen Pharmaceuticals), L778.123 (un inhibidor de proteína farnesilo transferasa de Merck & Company, Whitehouse Station, New Jersey), BMS 214662 (un inhibidor de proteína farnesilo 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 EGFR cinasa), anticuerpos de EGFR (por ejemplo, C225), GLEEVECTM) (inhibidor de C-abl cinasa de Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, New Jersey); interferones, tales como, por ejemplo, Intron (de Schering-Plough Corporation), Peg-Intron (de Schering-Plough Corporation); combinaciones de terapia hormonal; combinaciones de aromatasa; ara-C, adriamicina, Cytosan, y gemcitabina.

Sujetos

Los métodos profilácticos y terapéuticos de la presente descripción pueden aplicarse a cualquier sujeto adecuado. En algunas realizaciones, 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 lo tanto, el sujeto puede ser un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano o un mamífero no humano.

A continuación, se describe la presente invención haciendo referencia a ejemplos específicos.

Ejemplos

Materiales y métodos:

Estirpes celulares

Las estirpes celulares de cáncer ovárico humano OVCAR-3, SKOV-3 y A2780 y las células primarias células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y todas las demás estirpes celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y se mantuvieron siguiendo sus instrucciones. Los astrocitos y estirpes celulares de glioma fueron obtenidas del Dr. Kerry McDonald, del Lowy Cancer Research Centre, University of New South Wales, Australia.

Ensayo de proliferación celular

Se evaluó la proliferación celular utilizando el ensayo de sulforrodamina B (SRB). Las células sembradas en una placa de 96 pocillos (2.000 a 3.000 células/pocillo) se trataron con MPL (0, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 μ moles/l) durante 72 h. A continuación, se fijaron las células, se lavaron y se tiñeron con 100 μ l de SRB al 0,4% (p/v) disueltos en ácido acético al 1%. El pigmento no unido se eliminó mediante cinco lavados con ácido acético al 1% antes de secar al aire. El SRB unido se solubilizó con 100 μ l de base Tris 10 mM (pH 10,5) y se leyó la absorbancia a 570 nm. Se utilizó exactamente el mismo procedimiento para evaluar el MPL-SO₂. Se disolvieron ambos agentes en etanol y se diluyeron con medio, proporcionando 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 μ M durante 24, 48 o 72 h. Se disolvió monepantel (obtenido de Novartis, Basel, Suiza) en etanol al 100% y después se diluyó con el medio de cultivo celular. Al final del periodo de tratamiento, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se contaron utilizando azul tripán y un hemocitómetro. Todos los puntos experimentales se fijaron por cuadruplicado y cada experimento se llevó a cabo por lo 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 dejó que se adhiriesen durante la noche. Se separó el medio mediante aspiración y las células en crecimiento exponencial se incubaron con diversas concentraciones de MPL durante 72 h. En este punto, se aspiró el medio, se lavaron las placas con PBS y se añadió el medio sin fármaco a cada placa. Se cambiaron los medios dos veces a la semana durante 3 semanas. A continuación, las placas se lavaron

suavemente con PBS y las células se fijaron con etanol al 100% y se tiñeron con una solución al 0,5% de cristal violeta filtrada. Las colonias que consistían de más de 50 células se contaron bajo un microscopio invertido.

Análisis del ciclo celular

Se determinó el efecto de MPL sobre el ciclo celular utilizando protocolos y procedimientos estándares de análisis de citometría de flujo. Brevemente, $0,7 \times 10^6$ millones de células sembradas en matraces de 25 cm^3 y que se habían dejado adherir durante la noche se trataron con MPL durante 24 o 48 h. Se recogieron las células con tripsinización y se agruparon con las células que flotaban en el medio. Las suspensiones celulares se centrifugaron, se lavaron con PBS y se fijaron con metanol. A continuación, se lavaron las células, se resuspendieron en yoduro de propidio y ribonucleasa A en PBS durante 30 min a temperatura ambiente y se analizaron mediante citometría de flujo (Becton Dickinson FACSort).

Análisis de transferencia western

Se determinó la expresión de proteínas en las células utilizando el análisis de transferencia western. Tras el tratamiento con las concentraciones indicadas de MPL, se prepararon lisados celulares y se sondearon con anticuerpos para cdk2, cdk4, ciclina A, ciclina E, PARP-1 (diluciones 1:1.000, Cell Signalling Technology) y p53 (diluciones 1:200, Santa Cruz Technology). Se verificó una carga comparable de proteínas en el gel mediante nuevo sondeo de las membranas con un anticuerpo de GAPDH (diluciones 1:30.000, Sigma-Aldrich).

Experimentos *in vivo*

Se obtuvieron ratones desnudos hembra (6 semanas de edad) de Biological Resources (University of New South Wales): Las autorizaciones de ética animal institucionales cubrieron los procedimientos llevados a cabo en los ratones. Brevemente, se inyectaron $2,5 \times 10^6$ células OVCAR-3 en crecimiento en fase logarítmica s.c. en el flanco izquierdo de cada ratón. Los animales se pesaron una vez a la semana, mientras que sus volúmenes tumorales se determinaron dos veces a la semana. Se monitorizó el crecimiento tumoral mediante mediciones con calibrador de los diámetros ortogonales y el volumen tumoral estimado se calculó basándose en la fórmula $1/2 (\text{Longitud} \times \text{Anchura}^2)$, en donde la anchura es la más corta de las dos mediciones ortogonales. Basándose en la autorización ética institucional, los ratones se sacrificaron antes de que el volumen tumoral alcanzase 500 mm^3 . El tratamiento se inició el día 8 después de la inoculación de células tumorales, momento en que los ratones fueron aleatorizados y asignados a los grupos tratados con MPL o con vehículo (5-6 ratones en cada grupo). Se suspendió MPL en hidropoxi-metilcelulosa (HPMC al 0,5% p/v), se esterilizó mediante sonicación y se administró en días alternos por vía intraperitoneal (i.p.) o por vía oral con sonda (100 μl).

En el primer ensayo piloto, se administró el fármaco por vía i.p. a una dosis de 2,5 o 25 mg/kg de peso corporal, tres veces a la semana durante 2 semanas.

Tras el resultado, en el siguiente conjunto de animales, la dosis se incrementó a 25 y 50 mg/kg, tres veces a la semana.

En el último (tercer) estudio piloto, los ratones fueron tratados por vía oral. Las dosis administradas fueron de 50 y 100 mg/kg tres veces a la semana. En la totalidad de dichos ensayos, los ratones en los grupos de control recibieron un volumen similar de vehículo (HPMC al 0,5%). Se llevó a cabo histología/inmunohistoquímica tumoral en secciones de tumor fijado en formalina, siguiendo procedimientos estándares.

Análisis estadístico

Todos los datos se informan como medias $\pm$ errores estándares (S.E.M.) de por lo menos dos experimentos independientes. Las diferencias de volumen tumoral entre el grupo tratado con MPL y el grupo de control se analizaron utilizando un ANOVA univariante con pruebas post-hoc de Dunnett. Se compararon las variables cuantitativas utilizando la prueba t de Student. Se definió diferencia estadísticamente significativa como $P < 0,05$.

Resultados

MPL inhibe la proliferación celular

Se examinó el efecto de MPL sobre el crecimiento de las estirpes celulares de cáncer ovárico OVCAR-3, A2780 y SKOV-3. Mediante la utilización del ensayo de SRB, se examinó el efecto de MPL sobre la proliferación celular. MPL inhibió la proliferación de las células OVCAR-3, A2780 y SKOV-3 de una manera dependiente de la concentración, con valores de IC_{50} de 6,3, 10,0 y 29,3, respectivamente, según la Tabla 1. Resulta evidente a partir de dichos resultados que las estirpes celulares de cáncer ovárico son sensibles a los efectos antiproliferativos del MPL. Las células SKOV-3 fueron las menos sensibles. También se sometió a ensayo MPL-SO₂ de una manera similar utilizando el ensayo de proliferación de SRB. Se encontró que MPL-SO₂ era tan potente como MPL. MPL-SO₂ redujo la viabilidad de las estirpes celulares de cáncer que crecían en cultivo e

inhibió la proliferación celular. Los valores de IC₅₀ para MPL-SO₂ se presentan en la Tabla 1.

También se sometió a ensayo el efecto inhibitor de MPL sobre la proliferación celular en un abanico de células, tal como las células de cáncer de mama, de próstata y de mesotelioma. Se proporcionan los resultados obtenidos en la Tabla 1. Se proporcionan resultados adicionales en la Tabla 2.

Tabla 1: valores de IC₅₀ para MPL y MPL-SO₂ (tratamiento *in vitro* durante 72 h, ensayo de SRB)

Estirpes celulares	Tipo de cáncer	IC ₅₀ (μM)	
		MPL	MPL-SO ₂
OVCAR-3	Cáncer ovárico	6,3	5,5
A2780	Cáncer ovárico	10,0	4,2
SKOV-3	Cáncer ovárico	29,3	26
IGROV-1	Cáncer ovárico	6,1	-
1A9	Cáncer ovárico	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	Renales embrionarias humanas	50,5	-

Tabla 2: valores de IC₅₀ para MPL y MPL-SO₂ en la supresión de la proliferación de diversas estirpes celulares de cáncer

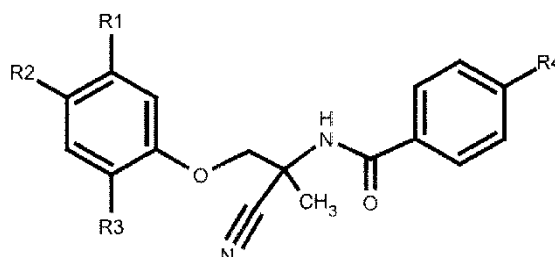
Estirpe celular	Tipo celular	IC ₅₀ (μM)	
		MPL	MPL-SO ₂
OVCAR-3	Cáncer ovárico	6,3 ± 0,8 ***	5,5 ± 1,3 ***
A2780	Cáncer ovárico	10 ± 3,8 **	4,2 ± 2,1 **
SKOV-3	Cáncer ovárico	31,18 ± 0,76 ***	26
IGROV-1	Cáncer ovárico	4,4 ± 0,27 **	4,4 ± 1,5 **
1A9	Cáncer ovárico	2,5 ± 0,45 **	3,42 ± 0,1 **
T47-D	Cáncer 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 5m11	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	Renales embrionarias humanas	34,57 ± 0,86 **	-

3T3	Fibroblasto	12,41 ± 0,37 **	11,2 ± 1,1 **
HaCat	Queratinocito	21,2 ± 3,2 **	42,68 ± 8,0 **
Astrocitos de feto humano	Astrocitos	85,55 ± 2,7 **	-
Sin asterisco = una determinación; ** = dos repeticiones; *** = tres repeticiones			

Tabla 3:

	AA D	AHC #	MW	Fórmula	OVCAR-3 IC ₅₀ μM	A2780 IC ₅₀ μM	CHO IC ₅₀ μM	HUVEC IC ₅₀ μM
1	450	0942648	382,77	C ₁₈ H ₁₄ C ₁ F ₃ N ₂ O ₂	23,85 ± 1,45	33,5 ± 8,5	45,87	96,5
2	907	2000020	416,32	C ₁₉ H ₁₄ N ₂ O ₂ F ₆	18,9 ± 4,1	27,65 ± 7,15	169	55,18
3	970	2000114	432,32	C ₁₉ H ₁₄ N ₂ O ₃ F ₆	>100	>100	142	139,8
4	1154	2001354	433,21	C ₁₈ H ₁₃ N ₂ O ₃ F ₃ Cl ₂	20,5 ± 0,5	28,0 ± 4,5	34,8	61,1
5	1336	2017686	479,20	C ₁₈ H ₁₂ N ₂ O ₃ F ₅ Br	14,65 ± 1,25	17,0 ± 1,2	31,8	61,3
6	1470	2033757	468,30	C ₁₉ H ₁₂ N ₂ O ₃ F ₈	12,9 ± 0,3	19,5 ± 4,1	32,2	74,0
7	004	2060021	416,75	C ₁₈ H ₁₃ N ₂ O ₃ F ₄ Cl	18,58 ± 2,4	27,3 ± 0,5	57,3	93,0
8	2009	2062412	416,75	C ₁₈ H ₁₃ N ₂ O ₃ F ₄ Cl	34,3 ± 4,3	75,9 ± 1,9	198	129,9
MPL-(S)	1566	2082782	473,39	C ₂₀ H ₁₃ N ₃ O ₂ F ₆ S	7,9 ± 0,9	11,3 ± 0,9	34,61	65,0
MPL-(R)	2224	2102224	473,39	C ₂₀ H ₁₃ N ₃ O ₂ F ₆ S	8,0 ± 0,7	14,75 ± 0,45	23,4	108,8
OVCAR-3, A2780 son cáncer ovárico epitelial humano; CHO = células de ovario de hámster chino; HUVEC = células endoteliales de vena umbilical humana								

AAD



5

Tabla 4: derivados de aminoacetoneitrilo (AAD) según la Tabla 3

AAD	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
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 ₂ 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

10 Según 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-metiletil]-4-trifluorometilsulfanil-benzamida.

15 Según los resultados mostrados en la Tabla 3, la proporción de valores de IC₅₀ (células normales/células de cáncer) para las AAD 907, 1336, 1470 y 2224 (MPL-(R)) muestran una actividad particularmente elevada. Además, se encontró que las AAD 2224 (MPL-(R)) y 1466 (MPL-(S)) eran equipotentes. Se indica que el enantiómero (R), MPL-(R), se ha demostrado anteriormente que no presenta actividad antihelmíntica.

Brevemente, se sometieron a ensayo MPL y MPL-SO₂ *in vitro* frente a un amplio abanico de estirpes celulares de cáncer con características de enfermedad ampliamente diferentes. Para estudios detallados adicionales, se seleccionaron las estirpes celulares de cáncer ovárico humano OVCAR-3 y A2780. Además, las células epiteliales de la superficie ovárica humana normales (HOSE) se cultivaron en presencia de MPL (0, 5, 10, 25, 50 y 100 µM) durante 72 h. Se evaluó la viabilidad celular utilizando el ensayo de azul tripán (figura 8). De manera similar, se investigó el efecto de MPL sobre el crecimiento de las células epiteliales, endoteliales, embrionarias y fetales normales (figura 9), mientras que la proliferación celular se evaluó utilizando el ensayo de SBR (figura 10). Las células de control (tratadas con vehículo) se consideró que presentaban una proliferación de 100% y los grupos tratados con MPL se expresaron como porcentaje del control ± SEM. Se sometió a ensayo cada concentración de fármaco por cuadruplicado y se repitió cada experimento por lo menos dos veces. Para las comparaciones estadísticas, cada grupo tratado con fármaco se comparó con el grupo de control utilizando una prueba t de Student. Para examinar el efecto del fármaco dependiente de la concentración, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA). Los valores de P eran: * = < 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 estirpes celulares de cáncer, mientras que las células normales resultan mucho menos afectadas. Con el fin de determinar si el efecto de MPL estaba mediado a través del receptor nicotínico de la acetilcolina y en particular el subtipo nAChR7, las células se pretrataron con antagonistas y después se expusieron a MPL (figura 11).

También se presentan los resultados obtenidos para MPL-SO₂. Puede observarse que MPL-SO₂ actúa en un orden similar al del fármaco parental, MPL. El rango de valores de IC₅₀ es muy estrecho y sugiere que MPL-SO₂ es tan eficaz como MPL en la supresión de la proliferación celular del cáncer (Tabla 2).

MPL inhibe la formación de colonias

Con el fin de investigar si MPL también perjudica la integridad reproductora y la capacidad de las estirpes celulares de establecer colonias, se investigó la actividad clonogénica de las células expuestas a MPL. Tras 72 h 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 perjudica profundamente la formación de colonias por dichas células. Las concentraciones más altas de MPL condujeron a una pérdida prácticamente completa de la capacidad clonogénica (figura 2).

Con el fin de determinar el efecto de MPL sobre la integridad celular y la capacidad de eliminar los efectos del fármaco tras la exposición y retirada del mismo, las células se incubaron con MPL (0, 5, 10 y 25 µM) durante 72 h, se lavaron con PBS, se transfirieron a placas de agar, se cultivaron con medio de crecimiento y se incubaron bajo condiciones estándares durante 2 semanas. A continuación, las células se fijaron con metanol al 100% y se tiñeron con cristal violeta al 1%. Se contaron las colonias (una agrupación de células superior a 50) bajo un microscopio (magnificación: x5). El número de colonias contadas para los diferentes grupos experimentales se expresa como porcentaje del control (figura 14). Estos resultados demuestran la inhibición dependiente de la concentración de la formación de colonias por MPL.

MPL detiene el ciclo celular mediante la regulación negativa de la expresión de ciclinas y cinasas dependientes de ciclina

Con el fin de investigar el mecanismo o mecanismos a través de los cuales MPL inhibe la proliferación celular y la formación de colonias, se examinó el efecto de MPL sobre el ciclo celular mediante 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 etapa G1 de una manera dependiente de la concentración y del tiempo. La acumulación de las células en la etapa G1 se vio acompañada por una rápida caída del porcentaje de células en las etapas S y G2-M. Con el fin de estudiar los mecanismos moleculares que actúan en la parada del ciclo celular inducida por MPL, se examinó la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular cdk2, cdk4, y de las 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 mediante la regulación negativa de la expresión de ciclinas y cinasas dependientes de ciclina que conduce a la inducción del corte de PARP-1.

Con el fin de investigar el mecanismo o mecanismos a través de los cuales MPL inhibe la proliferación celular y la formación de colonias, se examinó el efecto de MPL sobre el ciclo celular mediante citometría de flujo (FACS). Se encontró que MPL interfiere con la progresión del ciclo celular (figura 22). En células expuestas a MPL se detuvo el ciclo celular en la etapa G1 de una manera dependiente de la concentración y del tiempo. La acumulación de las células en la etapa G1 se vio acompañada por una rápida caída del porcentaje de células en las etapas S y G2-M. Con el fin de estudiar los mecanismos moleculares que actúan en la parada del ciclo celular inducida por MPL, se examinó la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular cdk2, cdk4, y de las ciclinas A y E. Las células tratadas con MPL expresaron niveles más bajos de cdk2, cdk4, las ciclinas E y A (figuras 4 y 16).

MPL induce el corte de PARP-1

Con el fin de investigar si la muerte celular inducida por MPL implica el corte de PARP, se llevó a cabo un análisis de transferencia western de lisados de células tratadas con MPL para PARP-1 y PARP-1 cortado. El corte de PARP-1 promueve la apoptosis mediante el bloqueo de la supervivencia inducida por la reparación del ADN. PARP ayuda a las células a mantener su viabilidad y, por lo tanto, el corte de PARP facilita el desensamblaje celular y sirve como marcador de las células que experimentan apoptosis. La figura 5 muestra que PARP es cortado en células tratadas con MPL.

MPL induce el corte de PARP

El análisis de transferencia western de lisados celulares preparados a partir de células OVCAR-3 y A2780 tratadas con MPL que muestran un corte altamente inducido de PARP que representa muerte celular (figura 17).

MPL reduce los niveles celulares de ATP

Tal como se ilustra en las figuras 18A y 18B, el tratamiento de las células OVCAR-3 o A2780 con MPL causa una reducción de los niveles de ATP observados en la célula.

MPL induce autofagia

La figura 6 muestra que el tratamiento de las células con MPL conduce a la formación de vacuolas, sugiriendo que MPL puede inducir autofagia en dichas células. La figura 7 muestra que el tratamiento de MPL reduce la proporción celular de ADP/ATP, que es otro indicador de autofagia celular.

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

Las figuras 19 a 21 muestran los ensayos *in vivo* de MPL en ratones desnudos. Los ratones portadores de tumores OVCAR-3 se trataron en primer lugar 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 i.p. como oral) en el profundo retardo del crecimiento tumoral en estos animales. La histología tumoral revela zonas masivas de muerte de las células tumorales (figura 22).

La inhibición de la proliferación celular acoplada con la supresión de la formación de colonias y los resultados *in vivo* muestran un efecto regulador del crecimiento de MPL. Se muestra la interferencia de MPL de la progresión del ciclo celular a través de la reducción de la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular A y E junto con sus cinasas cdk2 y cdk4. En la célula normal, la transición de una etapa a otra se produce de manera ordenada bien regulada por diversas proteínas. Las cinasas dependientes de ciclina (CDK) son proteínas reguladoras clave que resultan activadas en puntos específicos del ciclo celular, desempeñando de esta manera un papel crucial en la progresión del ciclo celular. Estos requieren ciclinas diferentes en diferentes etapas del ciclo. Las ciclinas A, D y E resultan necesarias para las etapas G1 y transición de G1 a S del ciclo celular. De las diversas CDK identificadas hasta hoy, CDK2 y CDK4 aparentemente resultan esenciales para la entrada en G1 y en la transición 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 entre varias enfermedades consideradas fenómenos relacionados con el ciclo celular.

Los resultados presentados en las figuras 19 a 21 demuestran la actividad de MPL de supresión del crecimiento tumoral s.c. en ratones desnudos hembra. El ensayo inicial reveló una actividad dependiente de la dosis de la administración i.p. de MPL. La dosis de 25 mg/kg resultó particularmente eficaz. Sobre esta base, se llevó a cabo el siguiente ensayo utilizando las dosis de 25 y 50 mg/kg bajo las mismas condiciones que anteriormente. La dosis de 50 mg/kg resultó más eficaz en el retardo del crecimiento tumoral en dichos animales. Como agente antiparasitario, se ha demostrado que MPL resulta eficaz por vía oral en varios modelos animales. Se sometió a ensayo la actividad terapéutica oral de las dosis de 50 y 100 mg/kg de MPL. En los tres ensayos piloto, se preparó MPL en HPMC al 0,5% y se administró en forma de una suspensión. El examen del tejido tumoral de dichos ensayos *in vivo* reveló zonas con necrosis extendida en los tumores tratados con MPL (figura 22).

Los efectos observados no se limitan al cáncer ovárico, tal como se muestra en las Tablas 1 y 2, y MPL suprimió eficazmente la proliferación celular *in vitro* en una diversidad de estirpes celulares que representan diversos cánceres, incluyendo el glioma, el cáncer de próstata, el cáncer de mama, el mesotelioma, el liposarcoma y el fibrosarcoma (ver las Tablas 1 y 2).

Otra observación importante es la actividad de MPL contra las estirpes celulares quimiorresistentes. Las células ováricas quimiorresistentes, las células de glioma resistentes a temozolimida y las células de cáncer de mama resistentes al tamoxifeno eran todas sensibles a la acción antiproliferativa del MPL.

En conclusión, los resultados demuestran que en las estirpes celulares de cáncer, el MPL y análogos (AAD):

- 1- inhiben la proliferación celular,

2- la inhibición inducida por MPL no resulta afectada ni positiva ni negativamente por el pretratamiento con agonistas o antagonistas nicotínicos, indicando que el modo de acción no se encuentra mediado por los receptores de nicotina,

2- inhiben la formación de colonias,

3- detienen el ciclo celular [etapa G1],

4- regula negativamente las proteínas reguladoras del ciclo celular (Cdk2, Cdk4, ciclina A y ciclina E),

5- bloquean la incorporación de la timidina en la célula, inhibiendo de esta manera la síntesis del ADN,

6- reducen los niveles celulares de ATP,

7- causan una autofagia progresiva, según confirma la conversión de LC3B-I en LC3B-II,

8- la autofagia era microscópicamente clara en estirpes celulares tanto de cáncer ovárico como de glioma,

9- el MPL indujo además el corte de PARP-1 y, de esta manera, la muerte celular,

10- lo anterior resulta confirmado por los datos *in vivo*, que muestran una supresión dependiente de la dosis de los tumores en ratones desnudos portadores de tumores s.c.,

11- tanto la ruta i.p. como a la ruta oral de administración resultan eficaces.

Además, el MPL inhibe la proliferación de las células resistentes a algunas quimioterapias estándares.

Comentario

Tal como se muestra en la Tabla 1, también se sometió a ensayo el MPL en células HUVEC. Se encontró que el valor de IC₅₀ era aproximadamente 10 veces más elevado que el valor de IC₅₀ en OVCAR-3, lo que refleja la potencia citotóxica más elevada del MPL sobre las células cancerosas que sobre las células no cancerosas.

En los ensayos de formación de colonias, el MPL suprimió la formación de colonias por las estirpes celulares de cáncer ovárico que crecían sobre placas de agar de una manera dependiente de la concentración y, por lo tanto, demuestran adicionalmente la eficacia del MPL en la inhibición del crecimiento de las células de cáncer.

Además, se ha demostrado que, con independencia del estado de p53 de las células [OVCAR-3 (mutadas), SKOV-3 (nulas) y A2780 (de tipo salvaje)], el MPL ejerció sus efectos anticancerosos (aunque a diferentes potencias). Lo anterior sugiere que el MPL resultaría eficaz en cánceres ováricos epiteliales con independencia del estado de p53 del tumor. Este resultado podría resultar de importancia ya que la mutación de p53 es muy común en un amplio abanico de cánceres.

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

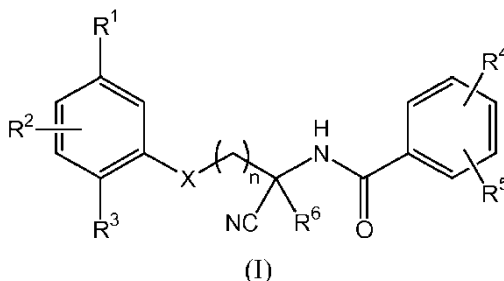
El ciclo celular de los mamíferos está controlado por la activación secuencial de las Cdk. La progresión a través de la etapa G1 y la entrada en la etapa S están reguladas por Cdk2 acomplexada con ciclina A y ciclina E. Por lo tanto, la supresión de la expresión de dichas proteínas reguladoras interrumpe el avance del ciclo celular.

La inhibición de la proliferación celular y la formación de colonias es dependiente de la concentración de MPL. Un posible mecanismo por el que el MPL interrumpe el avance del ciclo celular es la regulación negativa de las proteínas reguladoras del ciclo celular E y A y las cinasas dependientes de ciclina Cdk4 y Cdk2, causando la parada de G1. Como resultado de la parada de G1, las células no avanzan a la siguiente etapa del ciclo, tal como muestra la drástica reducción de las células en las etapas S y G2-M durante el tiempo. El porcentaje de células en la etapa G2-M del grupo tratado con vehículo fue más de tres veces superior que en el grupo tratado con 25 µM de MPL.

Además, la evidencia de autofagia en las estirpes celulares de cáncer tratadas con MPL sugiere fuertemente que las células salen irreversiblemente del ciclo celular mediante una parada del ciclo celular en la etapa G₀.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I) o sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para la utilización en el tratamiento de uno o más cánceres:



en el que:

R^1 es -CN;

R^2 , R^3 y R^5 se seleccionan cada uno independientemente de entre H, alquilo, halógeno, $-CF_3$ o -CN;

R^4 y R^6 se seleccionan cada uno independientemente de entre H, alquilo, halógeno, alcoxi, $-CF_3$, $-OCF_3$, $-SO_2CF_3$, $-SO-CF_3$ o $-S-CF_3$;

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

n es 1 a 20, y en el que el cáncer se selecciona de entre cáncer ovárico, cáncer de mama, cáncer de colon, mesotelioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer de piel, glioma, liposarcoma, fibrosarcoma y leucemia.

2. Compuesto según la reivindicación 1 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que R^2 es H o halógeno.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que R^3 es $-CF_3$ o halógeno.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que R^4 es $-S-CF_3$, $-SO-CF_3$, $-SO_2CF_3$, $-OCF_3$ o $-CF_3$.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que R^5 es H.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que X es O.

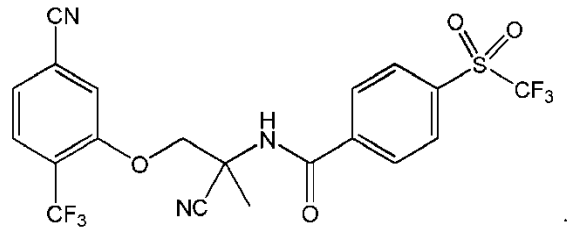
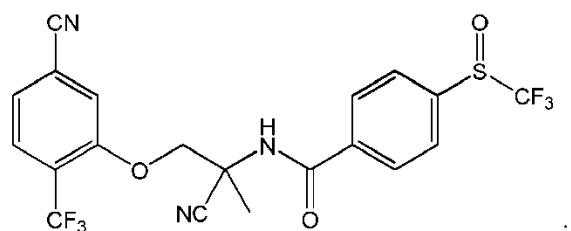
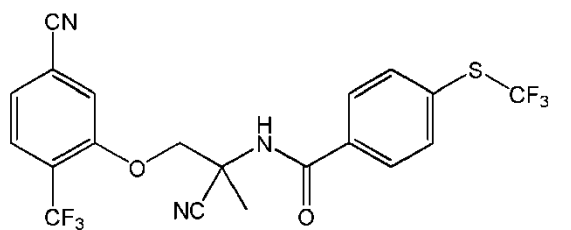
7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que n es 1.

8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que R^4 es *para* respecto a la fracción amida.

9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto es el enantiómero (*R*) o (*S*) o el racemato.

10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto es el enantiómero (*S*).

11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula (I) se selecciona de entre cualquiera de los compuestos siguientes:

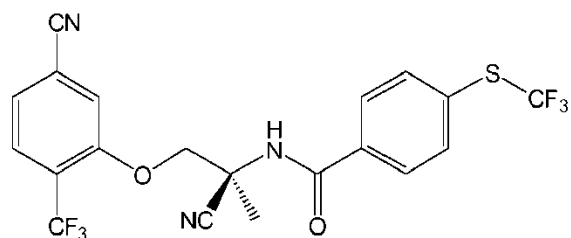


o

5

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

- 10 12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula (I) es MPL (N-[(1*S*)-1-ciano-2-(5-ciano-2-trifluorometil-fenoxi)-1-metil-etil]-4-trifluorometilsulfanil-benzamida):

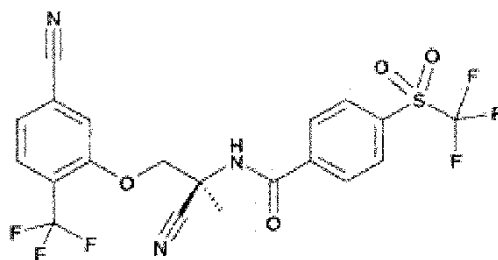


MPL

15

o sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

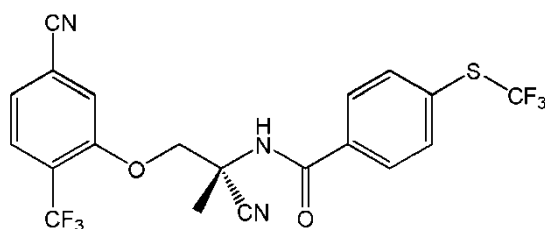
- 20 13. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula (I) es la sulfona de monepantel (MPL-SO₂):



MPL-SO2

o sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 14. Compuesto según la reivindicación 1 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula (I) es:



AAD 2224 (MPL-(R));

- 10 o sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

15. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que el cáncer está asociado a una cinasa.

- 15 16. Compuesto según la reivindicación 15 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que la cinasa es una cinasa dependiente de ciclina.

17. Compuesto según la reivindicación 16 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que la cinasa dependiente de ciclina es cdk₂ o cdk₄.

- 20 18. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que el cáncer se selecciona de entre cáncer ovárico, cáncer de mama, cáncer de colon, glioma o mesotelioma.

- 25 19. Compuesto según la reivindicación 18 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que el cáncer es un cáncer ovárico.

20. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que la leucemia es un tumor hematopoyético de la estirpe mieloide.

- 30 21. Compuesto según la reivindicación 20 para la utilización en un método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que la leucemia se selecciona de entre leucemia mielógena aguda y crónica o leucemia promielocítica.

Figura 1

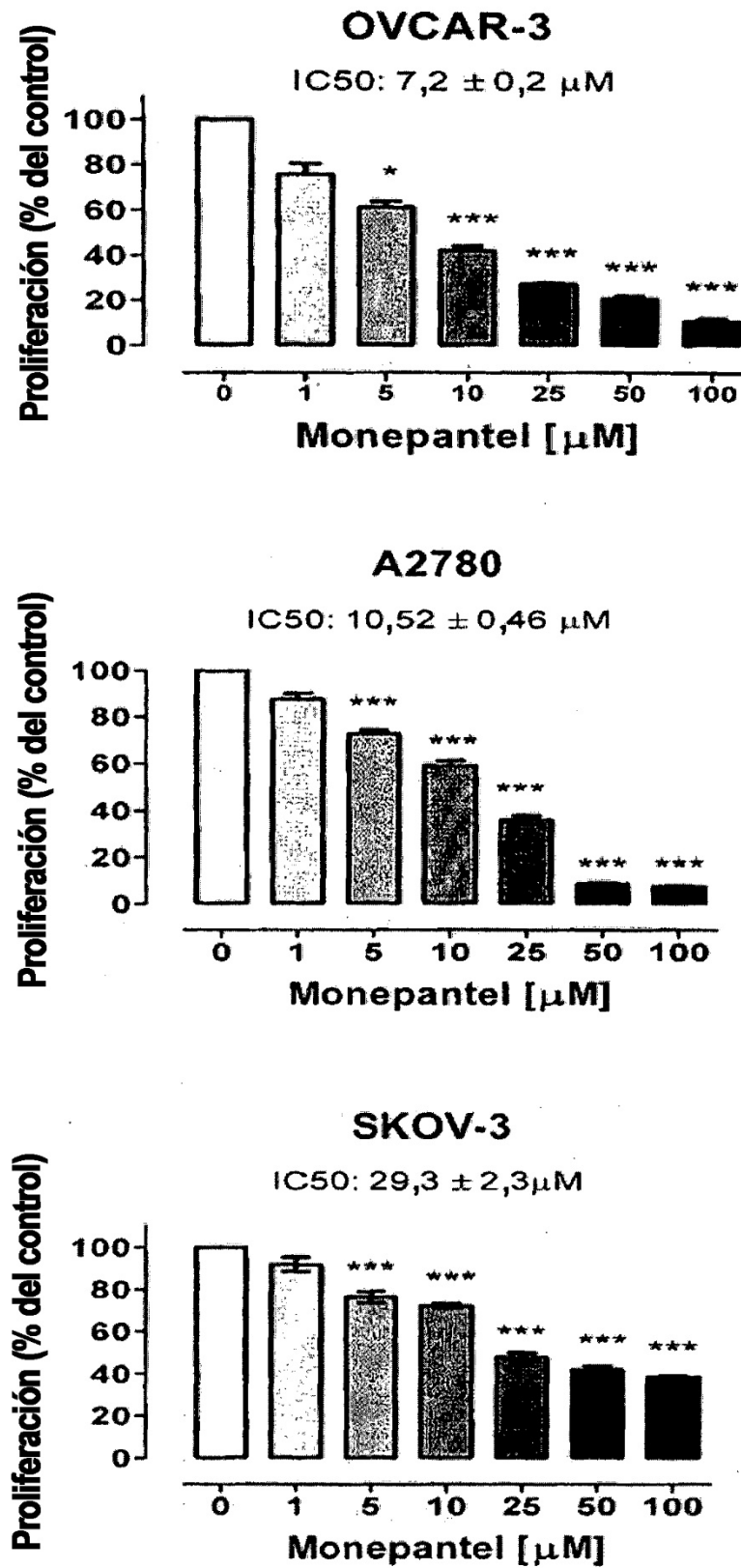


Figura 2

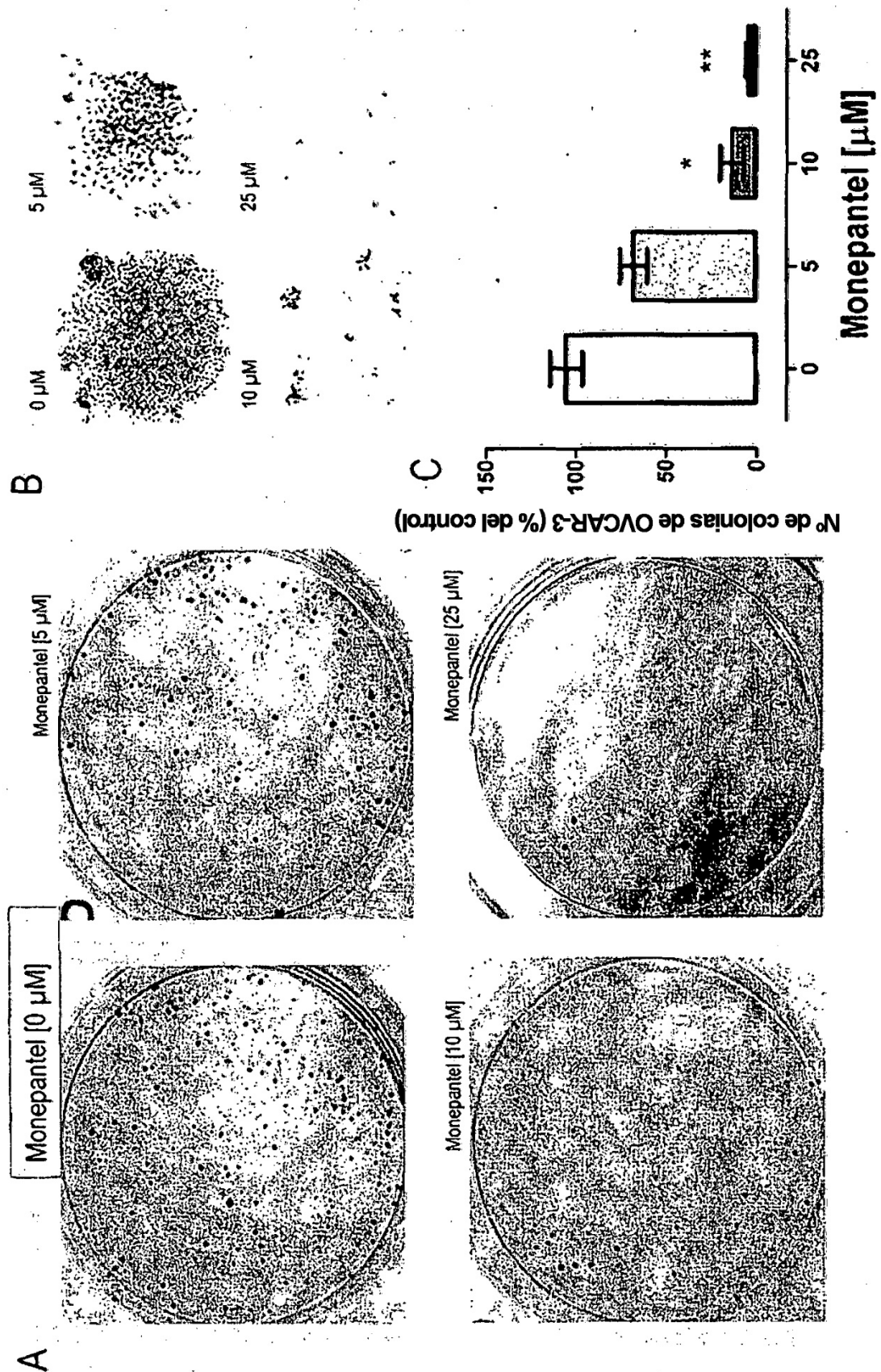
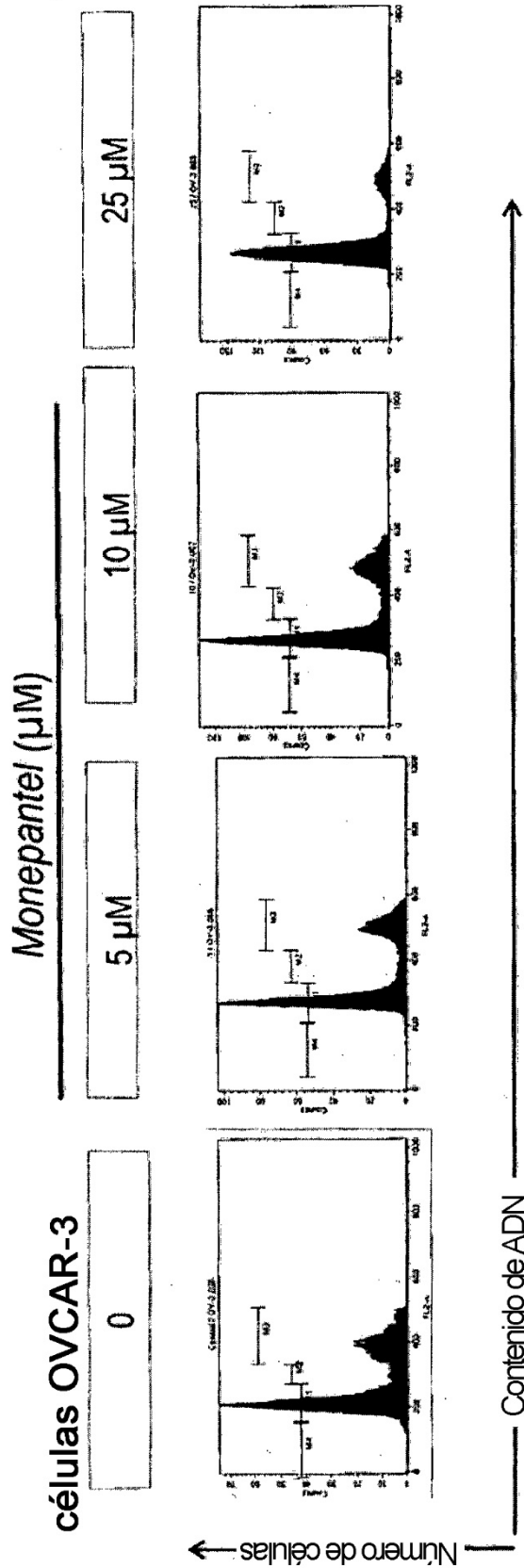
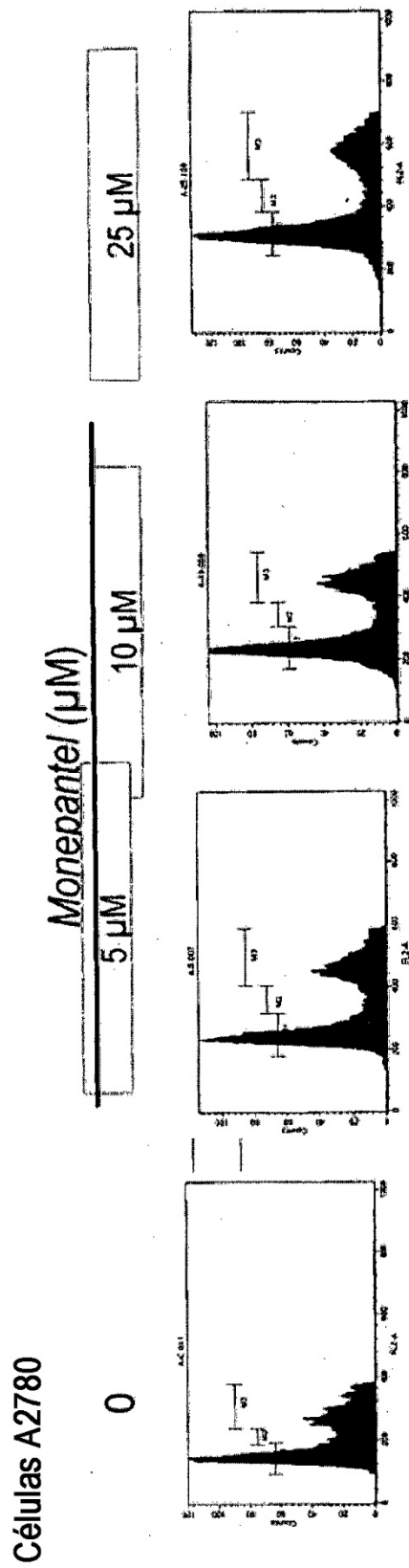


Figura 3a



	0	5	10	25
Sub-G1	0,51%±0,08%	0,32%±0,08%	0,23%±0%	0,48%±0,07%
G1	65,85%±6,50%	70,75%±6,85%	73,87%±5,44%	87,76%±2,22%
S	8,36%±1,89%	8,67%±2,13%	6,98%±0,81%	2,54%±0,55%
G2-M	23,51%±7,9%	20,3%±8,6%	18,94%±6,24%	6,2%±2,9%

Figura 3b



	0	5	10	25
Sub-G1	1,43% $\pm$ 0,23%	1,045% $\pm$ 0,02%	2,13% $\pm$ 0,16%	3,07% $\pm$ 0,05%
G1	52,02% $\pm$ 1,82%	55% $\pm$ 0,01%	58,83% $\pm$ 1,23%	63,14% $\pm$ 2,7%
S	10,43% $\pm$ 3,4%	9,65% $\pm$ 0,25%	9,46% $\pm$ 1,5%	7,02% $\pm$ 1,3%
G2-M	37,89% $\pm$ 3,45%	33,98% $\pm$ 0,18%	28,85% $\pm$ 1,6%	25,41% $\pm$ 0,3%

Figura 4

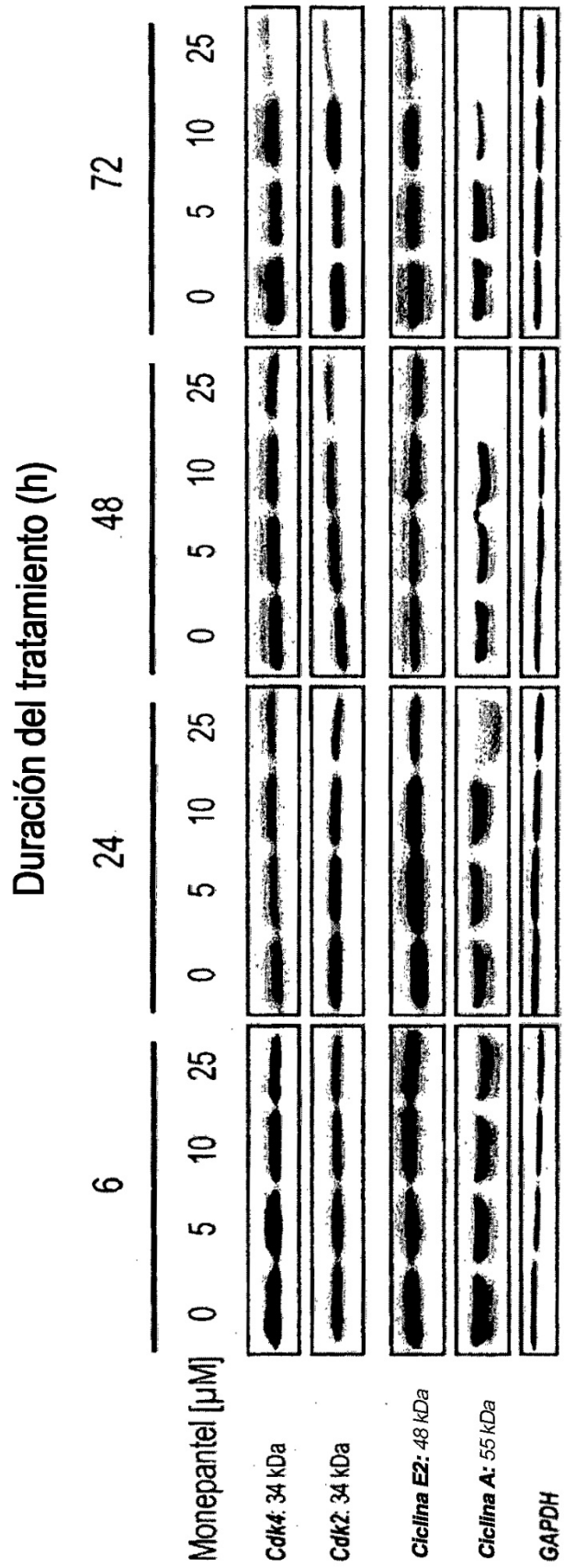


Figura 5

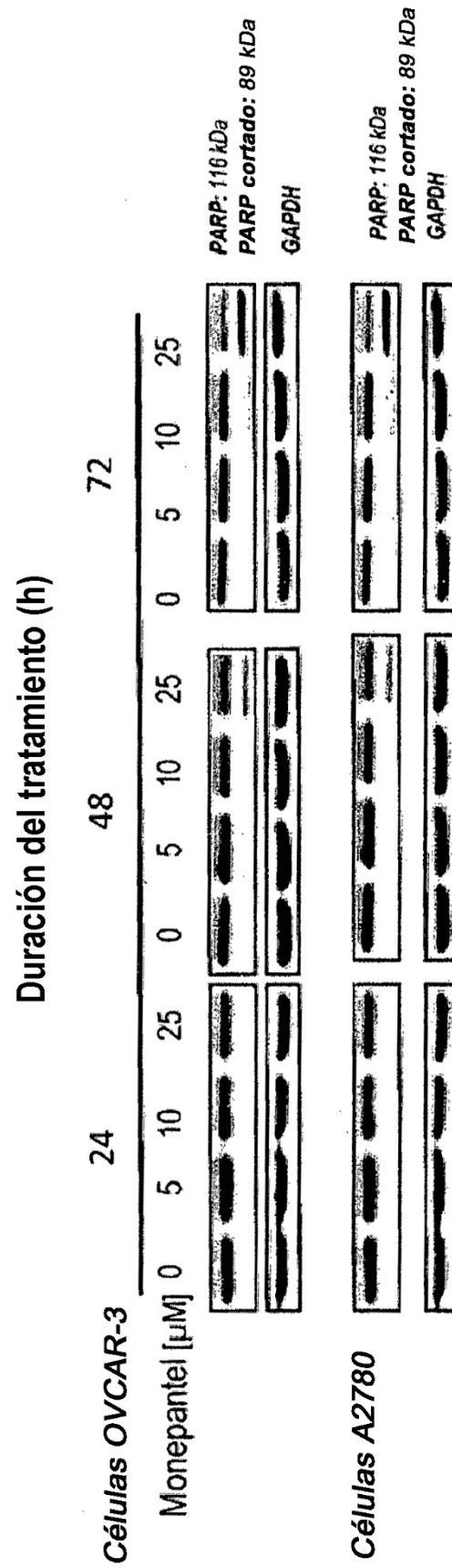


Figura 6

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

**Célula A2780 tratada durante
72 h con MLP 25 μ M**

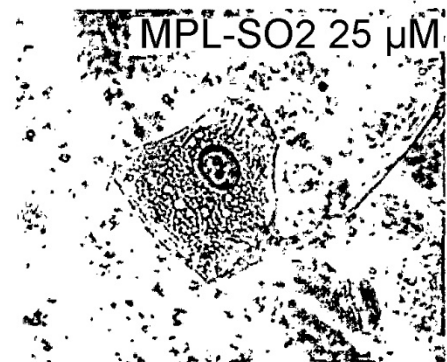
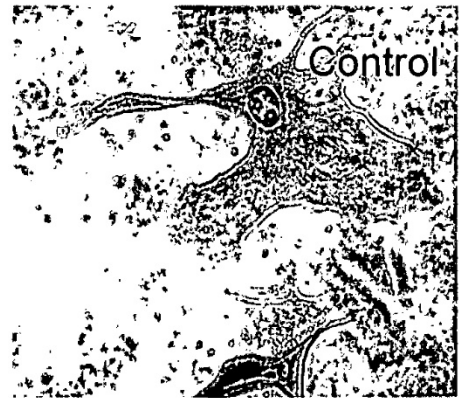
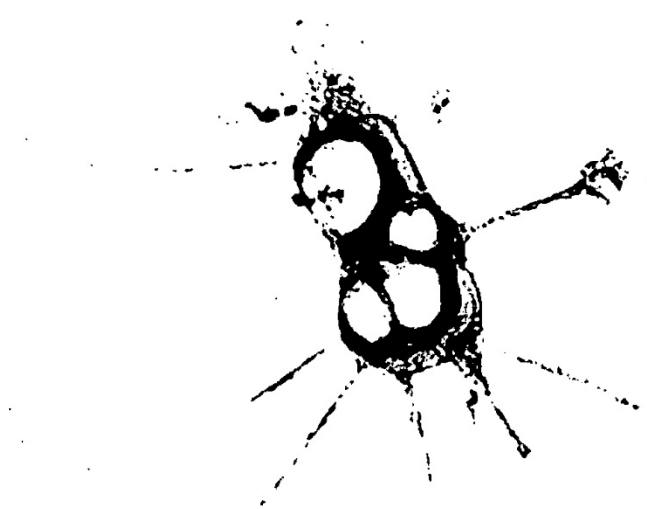


Figura 7

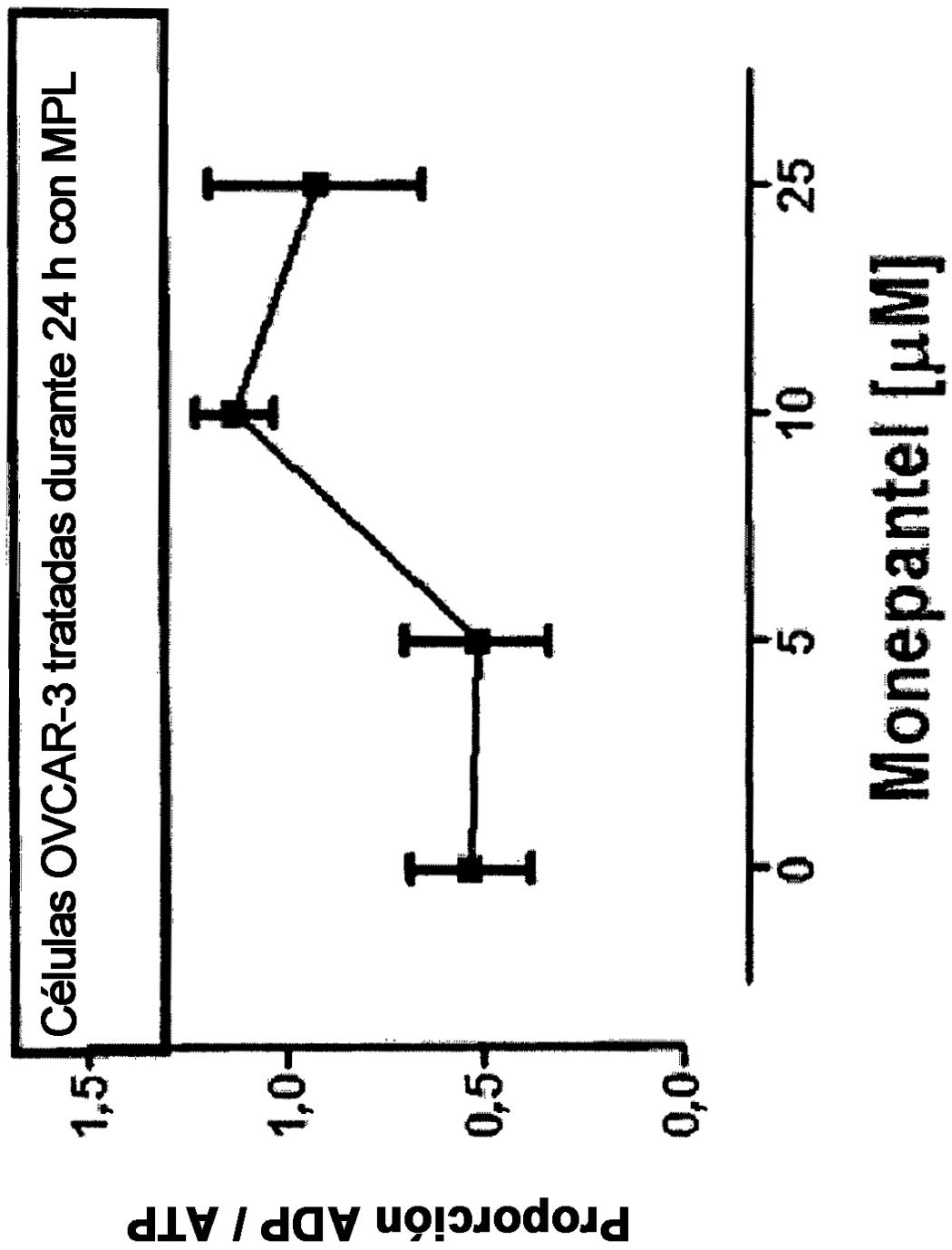


Figura 8

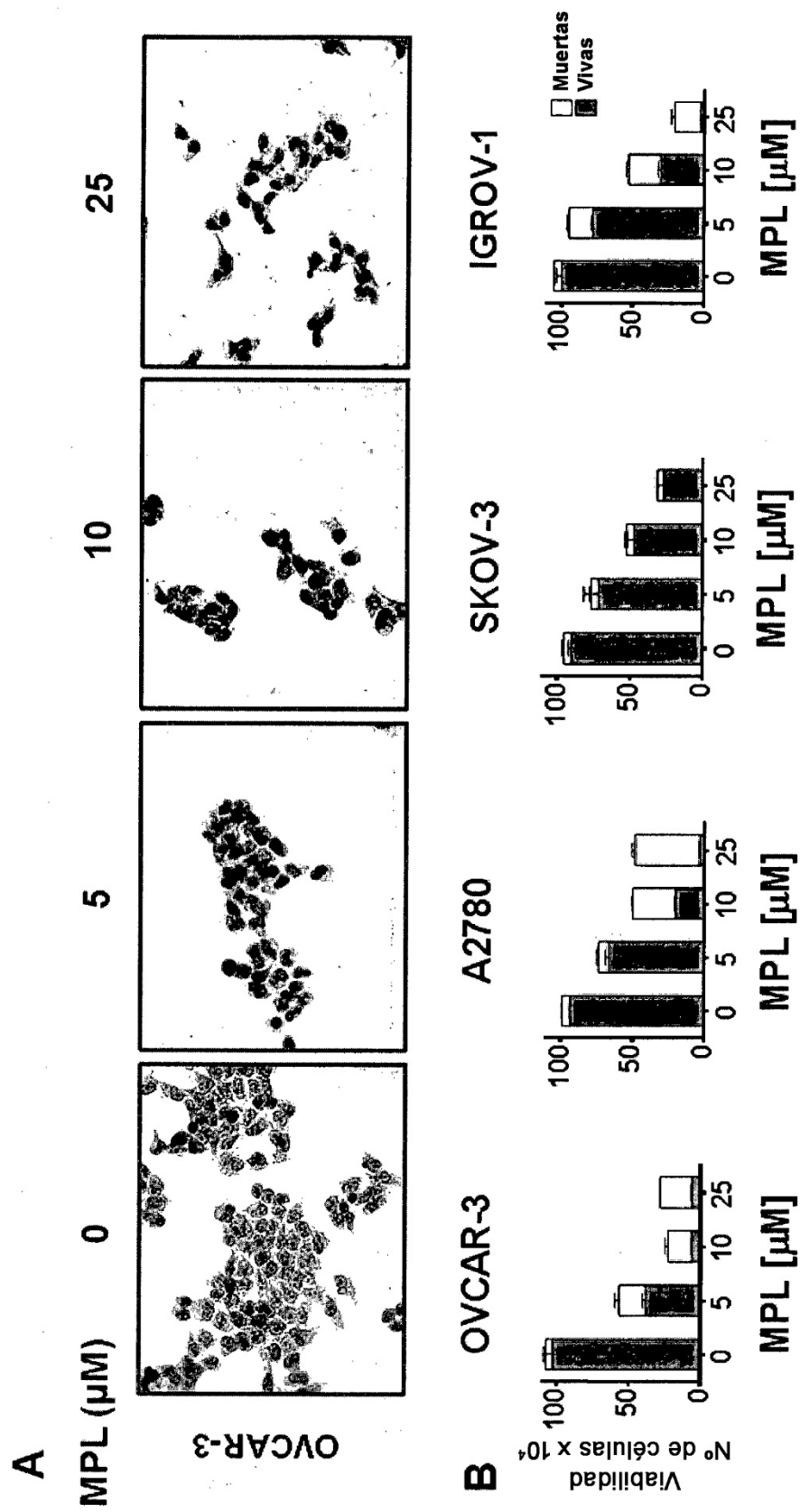


Figura 9

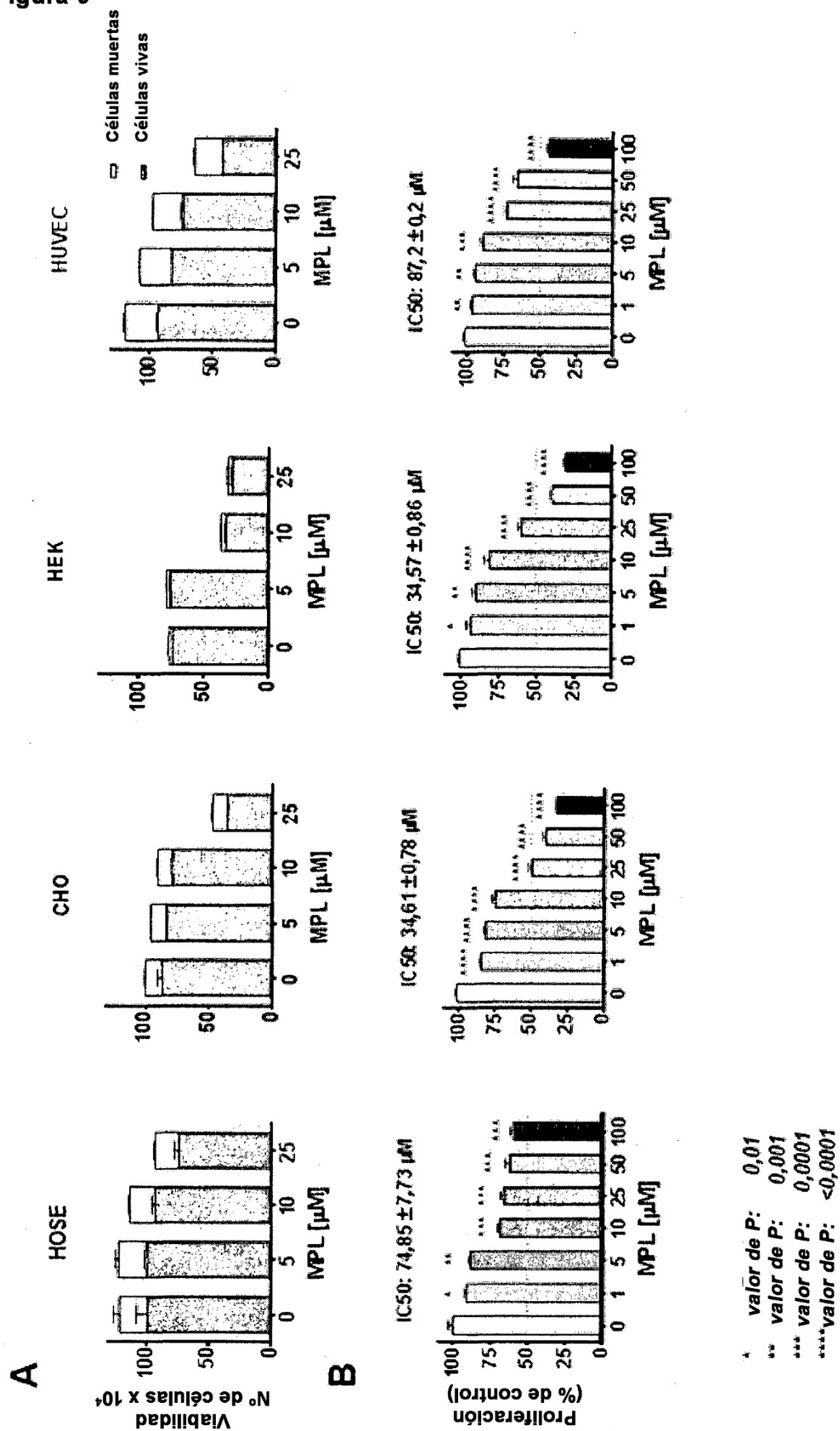
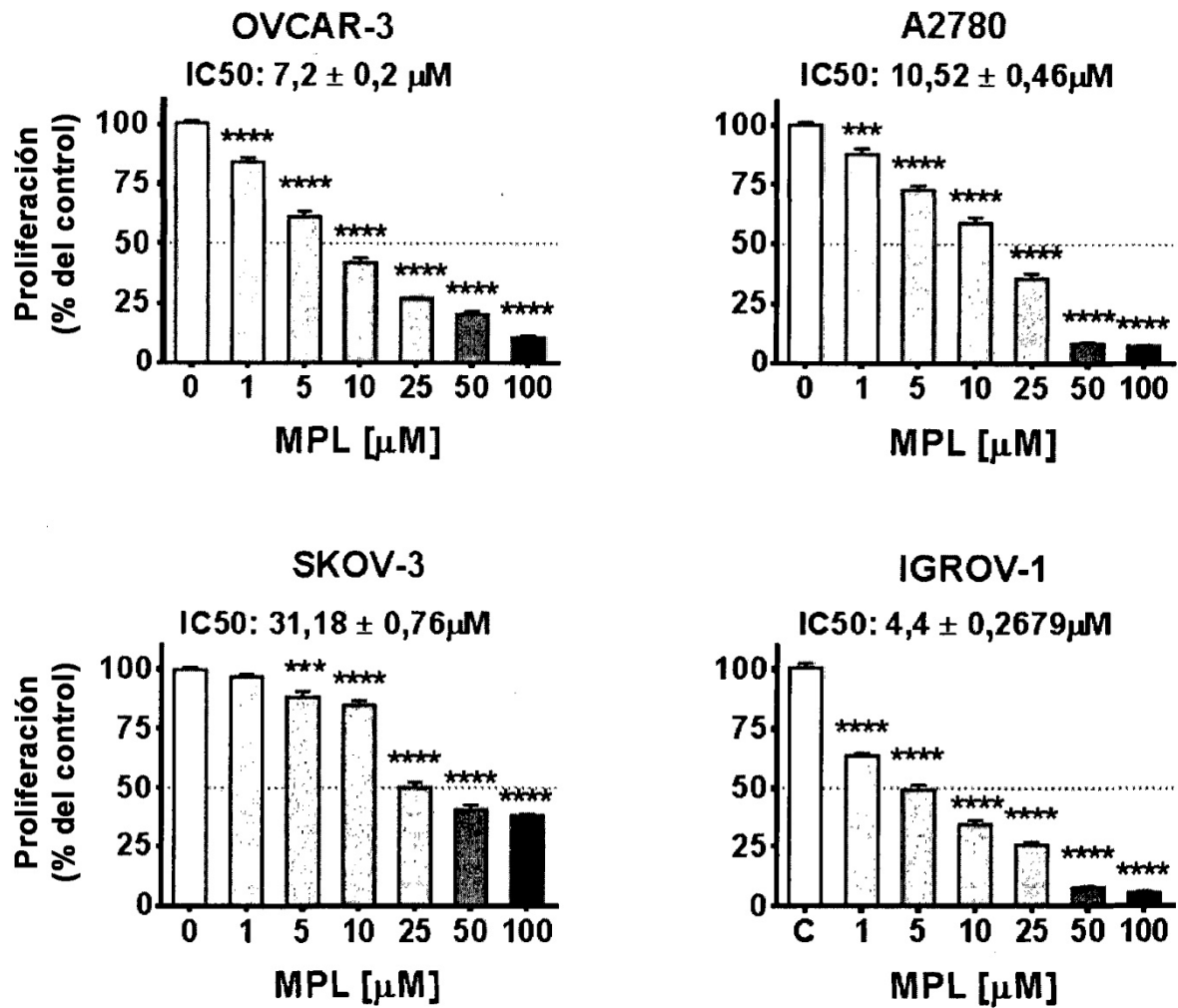


Figura 10



**** valor de P : $<0,0001$

*** valor de P : $0,0003$

Valor de P sin asterisco: $0,0699$

Figura 11

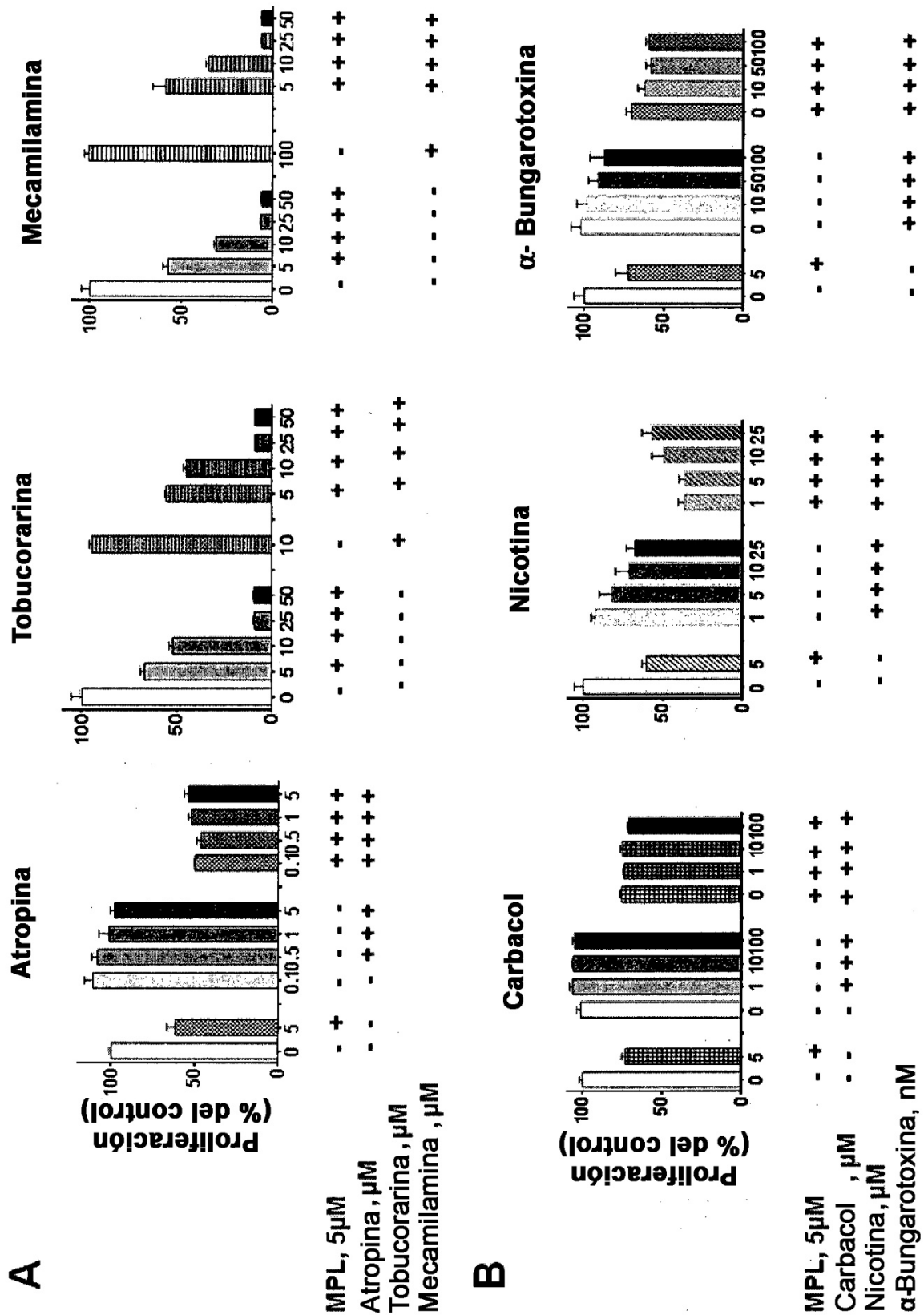


Figura 12

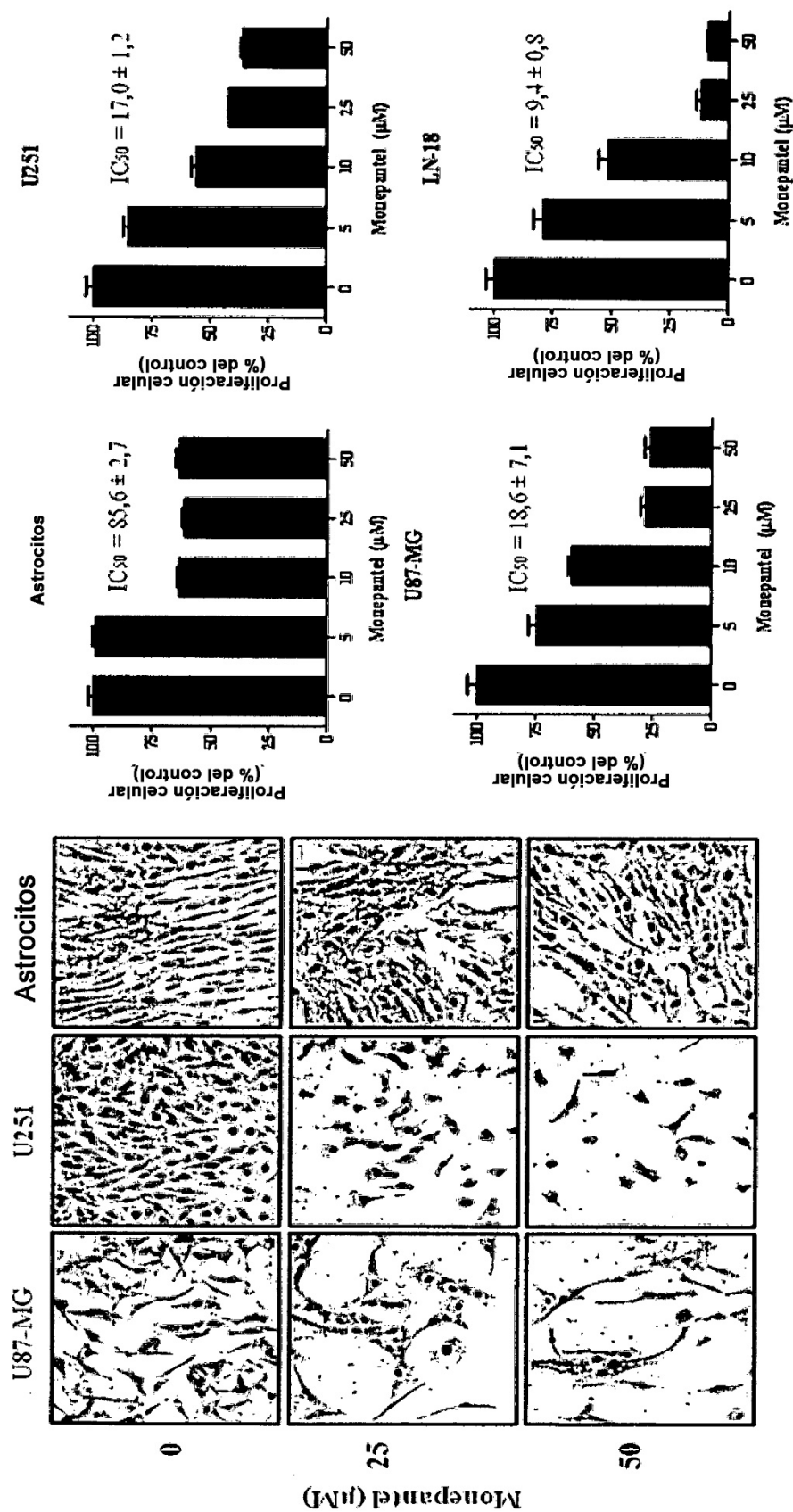


Figura 13

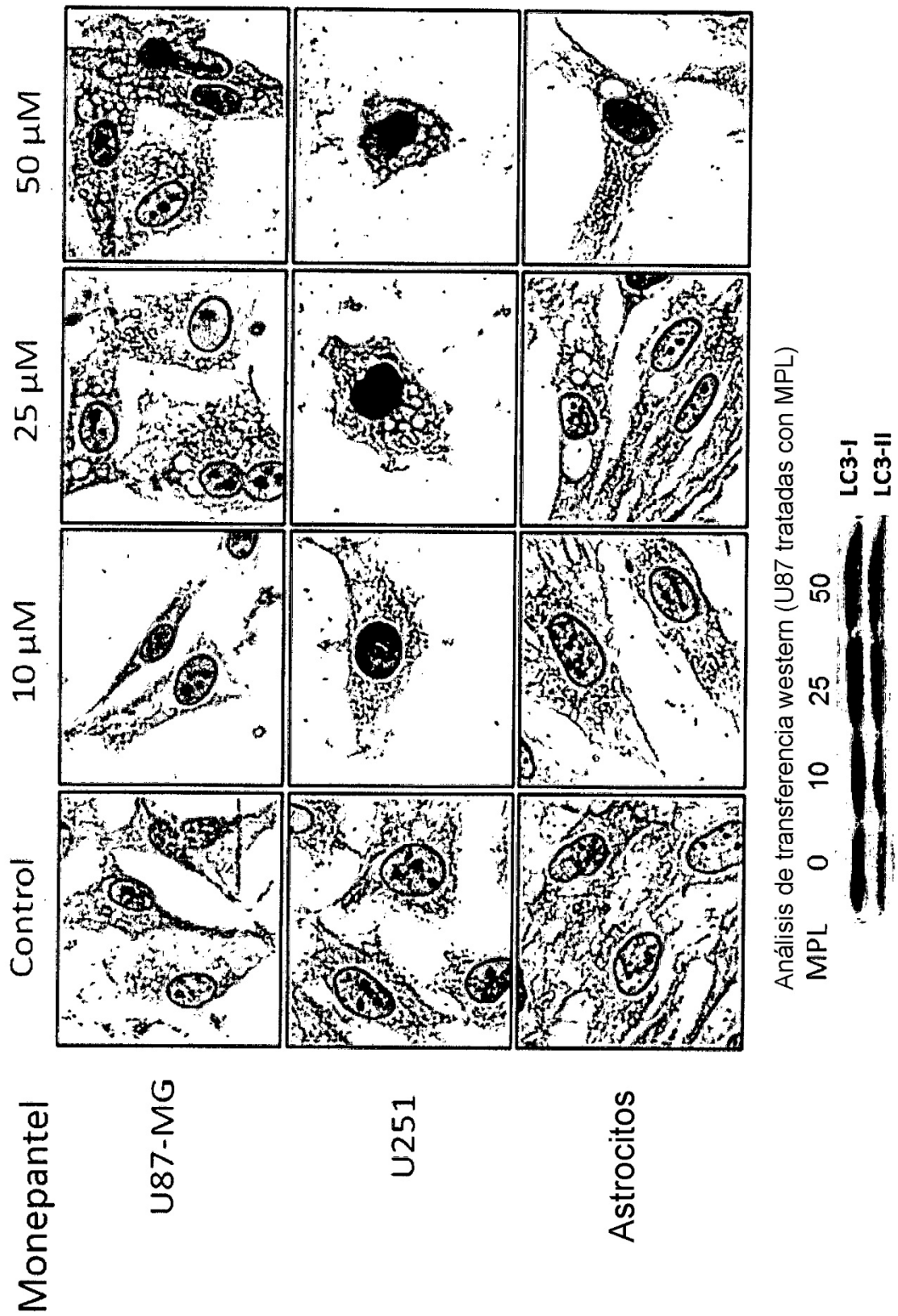


Figura 14

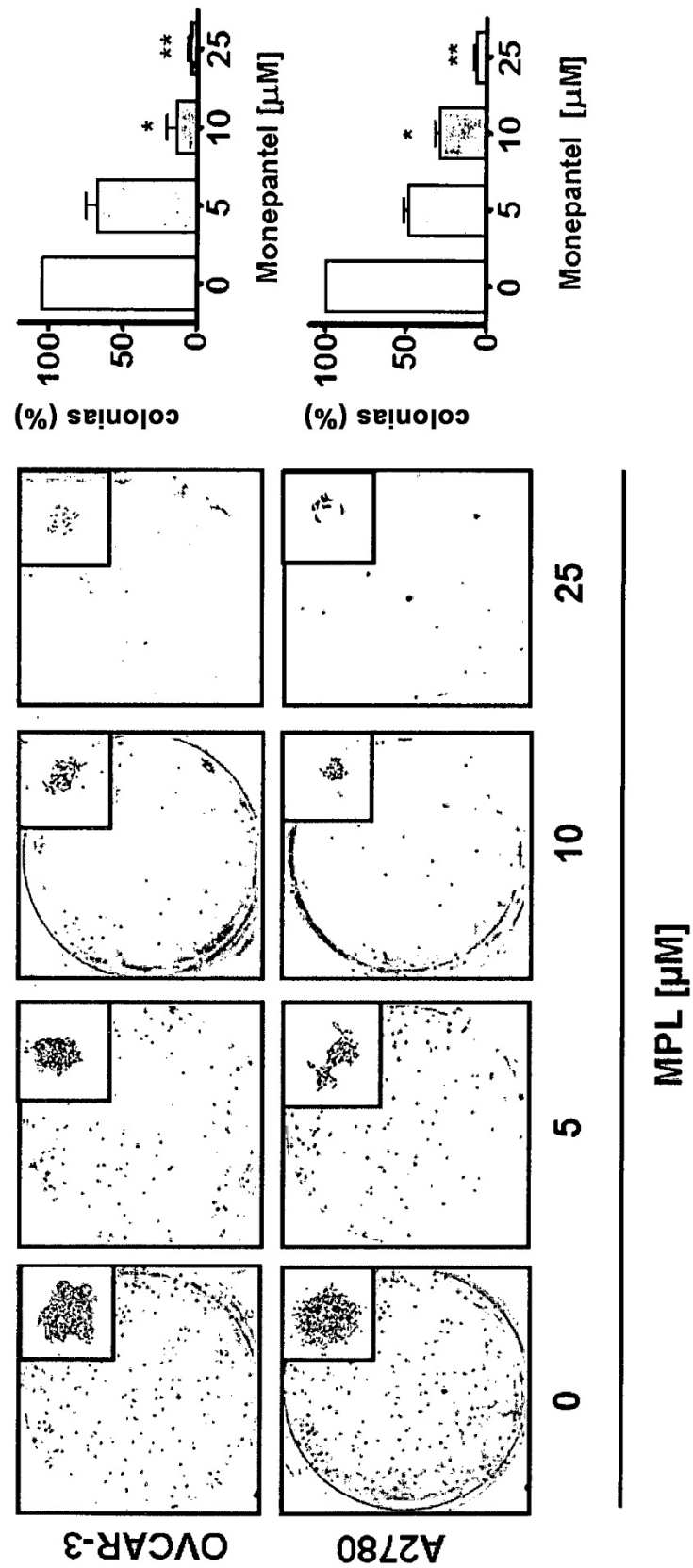


Figura 15

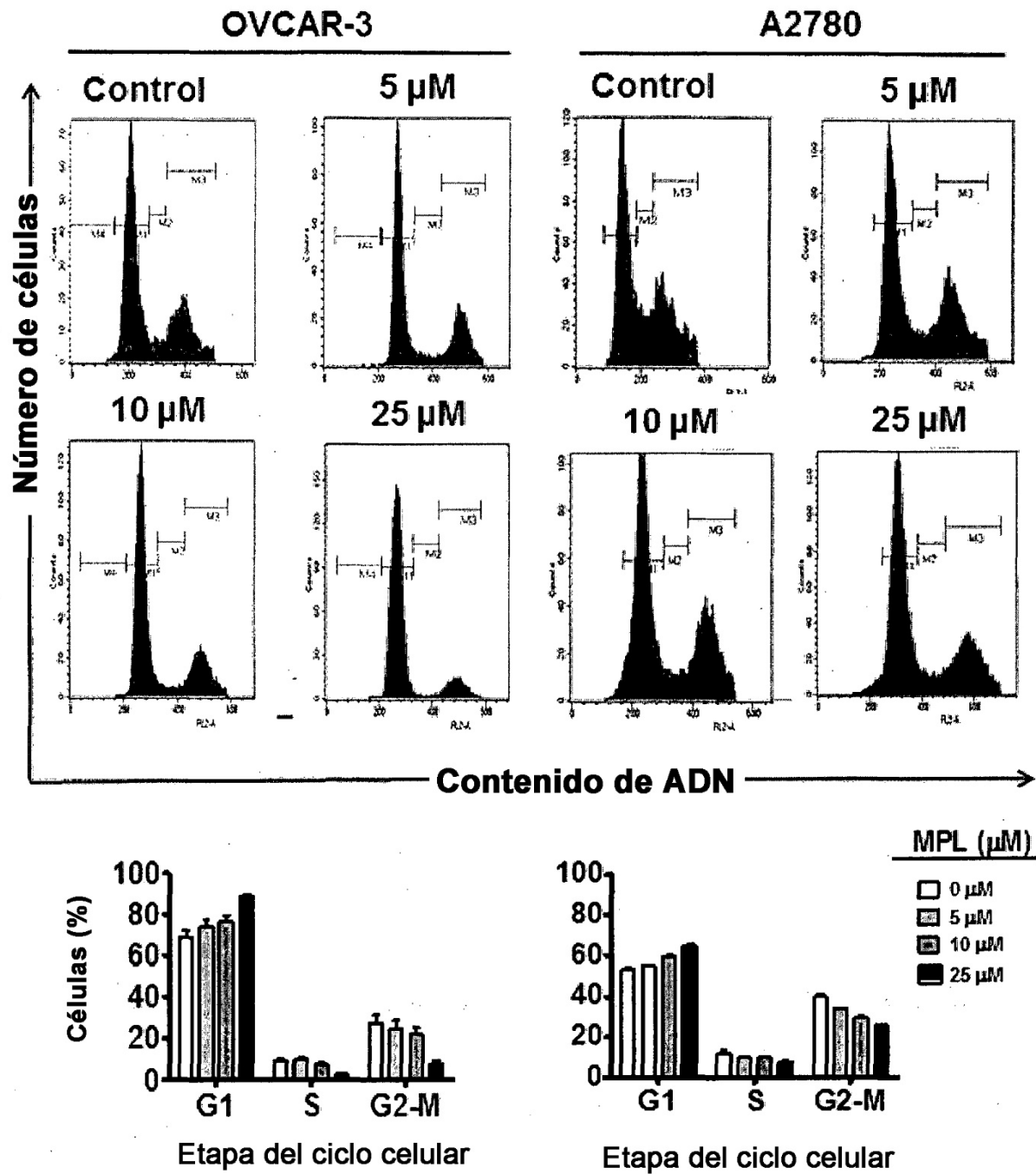


Figura 16

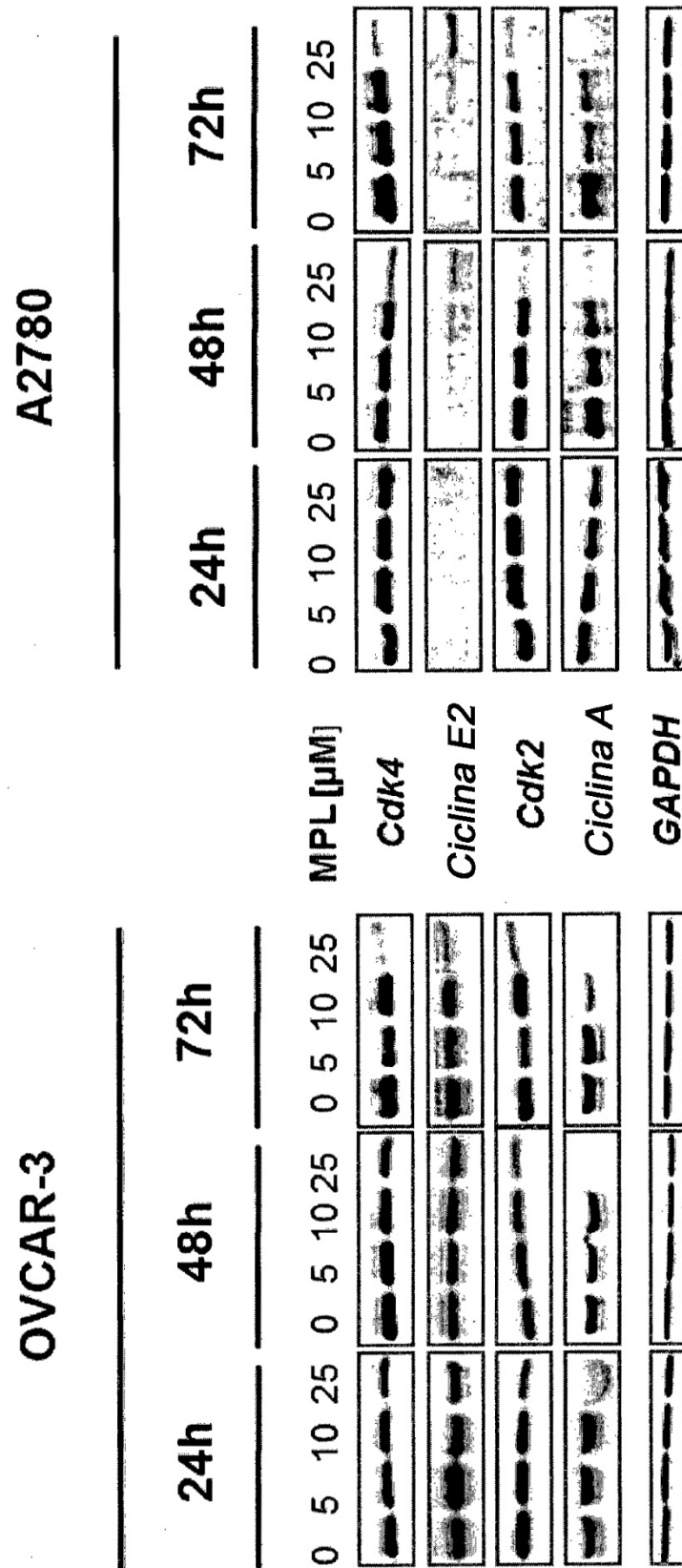


Figura 17

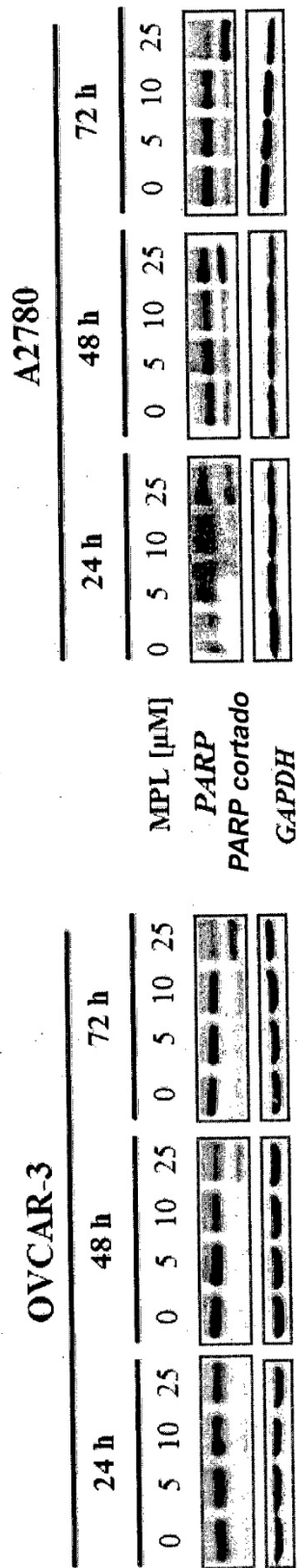


Figura 18A

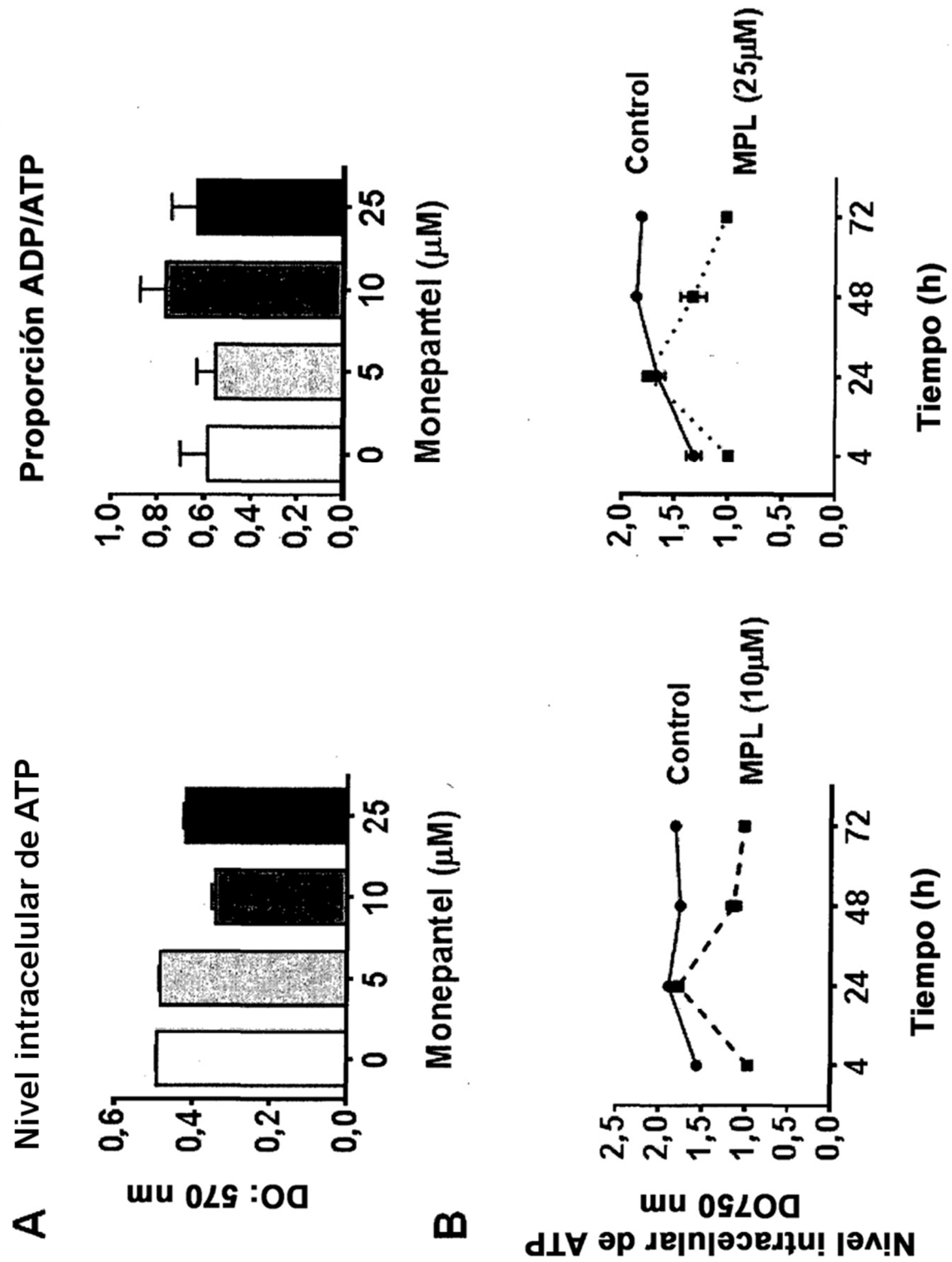


Figura 18B

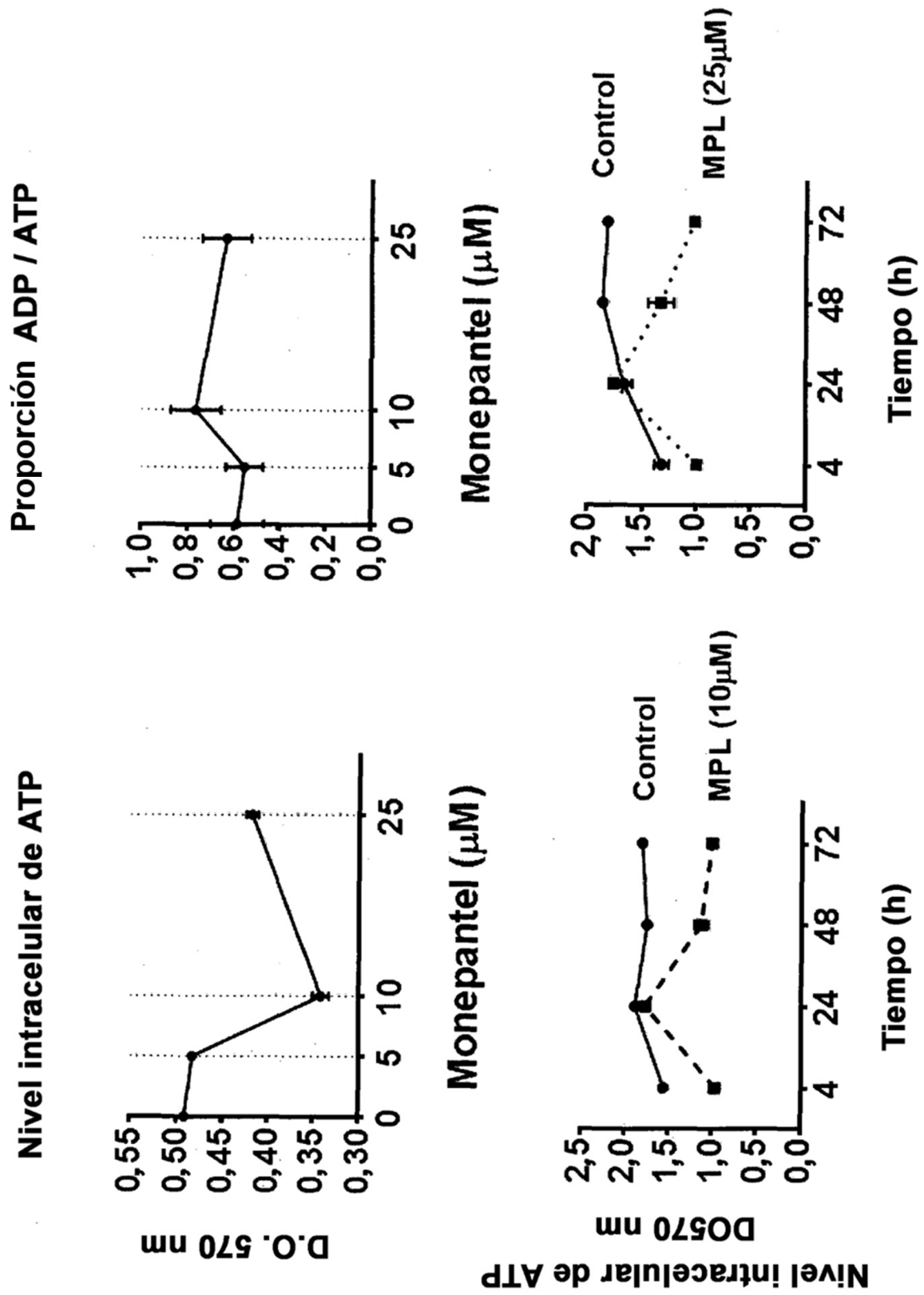


Figura 19

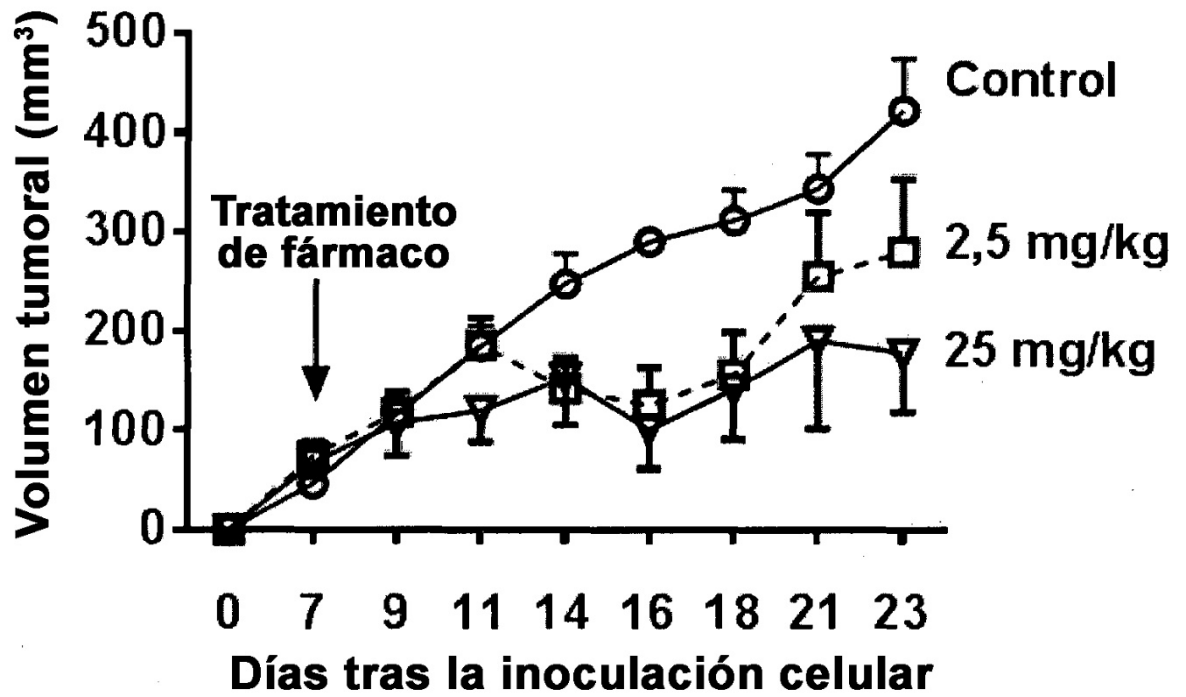


Figura 20

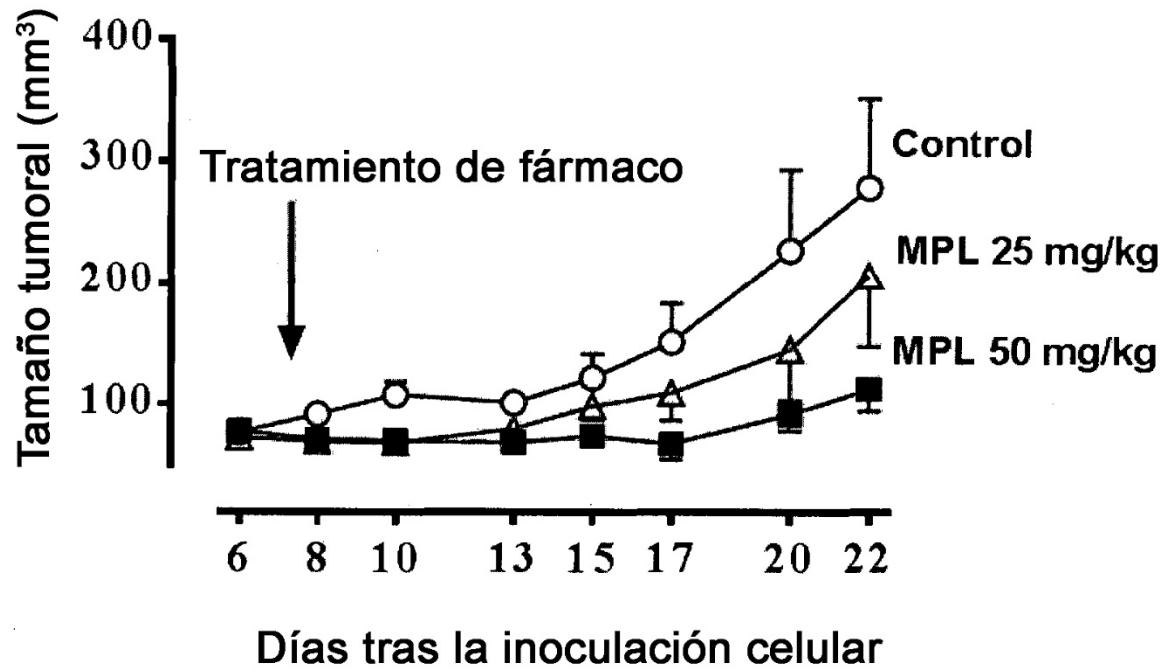


Figura 21

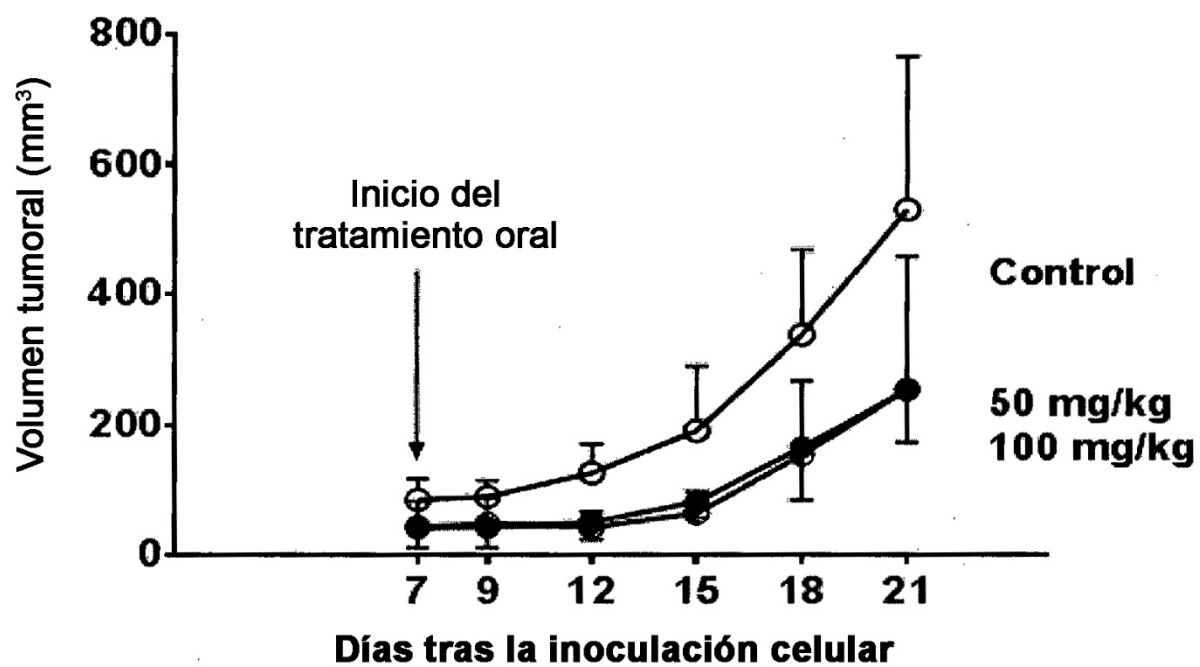


Figura 22

